Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire sowie Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Günther Pretzsch
aus Zeitz (Sachsen-Anhalt)

Düsseldorf
1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0013

Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire sowie Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Günther Pretzsch

aus Zeitz (Sachsen-Anhalt)

Düsseldorf

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. W. Peters

Referent : Professor Dr. G. Willuhn

Korreferent : Professor Dr. H. Weber

Tag der mündlichen Prüfung : 16.06.1982

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem Doktorvater,

Herrn Professor Dr. G. Willuhn,

danke ich herzlich für die stets hilfreiche Betreuung, Unterstützung und Förderung meiner Arbeit sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Großzügigkeit.

meinen Eltern

Ulrike

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Die Sesquiterpenlactone der Blütenkörbchen von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire 1

I. Einleitung 1

II. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone 9

1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Sesquiterpenlactonen in den Blütenkörbchen von A. chamissonis subsp. genuina Maguire 9

2. Extraktion der Sesquiterpenlactone und Fraktionierung des Extraktes 11

3. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanz E (Chamissonolid) 14

4. Isolierung und Strukturaufklärung eines zweiten neuen Pseudoguaianolids: 6-Desoxychamissonolid (Substanz B) 28

5. Isolierung und Identifizierung von Helenalin 38

6. Isolierung und Identifizierung von Helenalintiglinat 42

7. Isolierung und Charakterisierung eines weiteren Sesquiterpenlactons 44

III. Untersuchungen zur pharmakologischen Wirkung von Chamissonolid 51

1. Nachweis der sensibilisierenden Wirkung 51

2. Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Chamissonolid 53

3. Die Wirkung auf die Herztätigkeit 55

3.1. Untersuchung der Herzwirkung an der isolierten Muskelfaser 55

Seite

3.2. Die Wirkung von Chamissonolid auf den spontan schlagenden, rechten und den elektrisch gereizten, linken Meerschweinchenvorhof 57

4. Wirkung von Chamissonolid auf die glatte Muskulatur des Kaninchendarms 59

5. Test auf Beeinflussung der Atemfrequenz und -tiefe sowie des Blutdrucks durch Chamissonolid an narkotisierten Katzen 60

6. Prüfung der antiphlogistischen Wirkung von Chamissonolid 62

IV. Diskussion 64

V. Zusammenfassung 77

VI. Experimenteller Teil 80

1. Spektroskopische Methoden 80

2. Bestimmung der physikalischen Konstanten 81

3. Chromatographische Methoden 81

3.1. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren 81

3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie 83

3.3. Säulenchromatographie 84

3.4. Gaschromatographie 84

4. Herkunft, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials 85

5. Herstellung der Sesquiterpenlactonextrakte zur DC - Analyse 86

6. Isolierung der Sesquiterpenlactone 87

6.1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton-Gesamtfraktion 87

6.2. Säulenchromatographische Fraktionierung der S1 - Gesamtfraktion 88

6.3. Isolierung von Chamissonolid 90

Seite

6.4. Isolierung von 6-Desoxychamissonolid 91

6.5. Isolierung von Helenalin 92

6.6. Isolierung von Helenalintiglinat 92

6.7. Isolierung eines weiteren Sesquiterpenlactons 93

7. Isolierung von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid aus Blättern von A. chamissonis subsp. genuina 94

VII. Literaturverzeichnis 95

B. Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis 106

I. Einleitung 106

II. Phytochemische Charakterisierung der Rhizome, Stengel und Blätter von Costus spiralis 109

III. Die Steroidsaponine der Rhizome 110

1. Isolierung der Steroidsaponinfraktion 110

2. Isolierung und Identifizierung von Diosgenin 112

3. Identifizierung der Zucker 115

4. Quantitative Bestimmung von Diosgenin in den unterirdischen Organen 117

IV. Die Sterine der Rhizome 118

1. Fraktionierung des Petroletherextraktes 118

2. Identifizierung der frei vorliegenden Sterine 120

3. Die verestert vorliegenden Sterine 132

4. Die glykosidisch gebundenen Sterine 133

5. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine sowie der Anteile der frei, verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine 134

Seite

V. Identifizierung und quantitative Bestimmung von frei vorliegendem Diosgenin 138

VI. Diskussion 139

VII. Zusammenfassung 144

VIII. Experimenteller Teil 146

1. Allgemeine Angaben 146

2. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren 146

2.1. DC der Steroidsaponine und deren Aglyka 146

2.2. DC der Zucker 147

2.3. DC der Sterine 147

3. Gaschromatographie 149

3.1. GC der Zucker als Alditolacetate 149

3.2. GC der Sterine 149

4. Derivatisierungen 150

4.1. Acetatbildung 150

4.2. Bildung der Alditolacetate 150

5. Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials 151

6. Die Steroidsaponine der Rhizome 152

6.1. Gewinnung der Steroidsaponinfraktion 152

6.2. Isolierung von Diosgenin 153

6.3. Quantitative Bestimmung von Diosgenin 153

6.3.1. Photometrische Gehaltsbestimmung 153

6.3.2. Erstellung der Eichkurve 154

7. Die Sterine der Rhizome 156

7.1. Herstellung und Fraktionierung des Petrolätherextraktes 156

Seite

7.1.1. Isolierung der frei vorliegenden Sterine 156

7.1.2. Isolierung der verestert vorliegenden Sterine 158

7.2. Isolierung der glykosidisch gebundenen Sterine 158

7.3. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside 159

7.3.1. Erstellung der Eichkurve 159

7.3.2. Bestimmung der Gesamtsterine, der freien Sterine sowie der freien und veresterten Sterine aus dem Acetonextrakt 160

7.3.3. Bestimmung der freien Sterine, der freien und veresterten Sterine sowie der veresterten Sterine aus dem Petroletherextrakt 162

7.3.4. Bestimmung der glykosidisch gebundenen Sterine aus dem entfetteten Acetonextrakt 163

8. Isolierung von frei vorliegendem Diosgenin 164

IX. Literaturverzeichnis 165

A. Die Sesquiterpenlactone der Blütenkörbchen von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire

I. Einleitung

Die seit langem bereits volksmedizinisch verwendeten Blütenkörbchen von Arnica chamissonis Less. (TSCHIRSCH, 1917) sind heute als gleichwertige Austauschdroge für die von Arnica montana L. stammenden "Flores Arnicae" im 2. AB - DDR und der Ph. UDSSR IX (1961) offizinell. Der Grund für die Zulassung von A. chamissonis als zweite Stammpflanze für die "Arnicae flos" waren Engpässe in der Versorgung mit dieser Droge. Die Blütenkörbchen der europäischen A. montana, die außer im DAB 8 noch in 13 weiteren Pharmakopoeen geführt werden, müssen an natürlichen Wuchsorten gesammelt werden, da alle Kulturversuche bisher erfolglos waren. A. chamissonis läßt sich dagegen problemlos kultivieren. Oberdies gehört A. montana zu den geschützten Pflanzen. Sie ist in die Liste der besonders gefährdeten Pflanzenarten aufgenommen, die durch das Washingtoner Artenschutzabkommen einen besonderen Schutz erfahren sollen. Da auch die Bundesrepublik Deutschland diesem Abkommen beigetreten ist, ist in Zukunft der bisherige Import der Droge aus anderen Ländern (u.a. Jugoslawien, Spanien) nicht mehr gewährleistet, so daß auch für das nationale Arzneibuch die Frage nach einer gleichwertigen Austauschdroge aus der Gattung Arnica aktuell wird.
Die nordamerikanische Wiesenarnika, Arnica chamissonis Less., (Asteraceae) ist die am weitesten verbreitete Arnica - Art.

Ihr Areal reicht von Alaska im Norden bis nach New Mexico im Süden. Ober diesen weiten Bereich erfährt die Art eine beträchtliche, jedoch fließende Polymorphie, die zu taxonomischen Schwierigkeiten führt. MAGUIRE (1943) unterteilt A. chamissonis nach morphologischen und geographischen Gesichtspunkten in drei Unterarten:

1. A. chamissonis Less. subsp. genuina Maguire mit den Varietäten typica und interior
2. A. chamissonis Less. subsp. foliosa (Nutt.) Maguire (= A. foliosa Nutt.)
3. A. chamissonis Less. subsp. incana (A. Gray) Maguire.

HULTÉN (1968) hat die Unterart incana eingezogen und ihr den Rang einer Varietät von der Subspecies foliosa zugewiesen. Die derzeit gebräuchliche Nomenklatur (HULTÉN, 1968) unterscheidet somit nur noch zwei Unterarten:

1. A. chamissonis Less. subsp. chamissonis Maguire mit der Varietät interior Maguire
2. A. chamissonis Less. subsp. foliosa (Nutt.) Maguire mit der Varietät incana (A. Gray) Hultén.

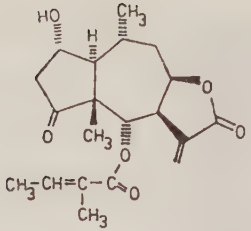
Allen Pflanzen dieser Arnica - Art gemeinsam sind 30 - 60 cm lange, weißlich-gelbe, im Alter braun werdende Rhizome mit einem Durchmesser von 2,5 - 5 mm, die bis auf kleinere, dunkle Knoten kahl sind. Die Stengel besitzen zahlreiche Blattpaare und zahlreiche halbkugelig-glockenförmige Blütenkörbchen.

Zur morphologischen Unterscheidung der beiden Unterarten besonders brauchbar sind die Stengelfärbung, der Blattansatz und die Behaarung. Bei der Unterart chamissonis sind die Stengel im unteren Teil deutlich rötlich-violett überlaufen. Die unteren Blätter sind sitzend bzw. schwach geflügelt, die Blattbehaarung ist gering. Bei der Unterart foliosa dagegen ist die Stengelbasis nicht oder nur geringfügig rötlich-violett gefärbt, die unteren und auch mittleren Blätter gestielt und die Blattbehaarung sichtbar bzw. bei der Varietät incana dicht weiß (KATING und Mitarb., 1973).
Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Unterart genuina (Nomenklatur nach MAGUIRE) hat ihre natürliche Verbreitung an den Küsten Alaskas und Kanadas und repräsentiert somit den nördlichen Formenkomplex dieser Art. Die Varietät typica mit größeren Blütenkörbchen (Durchmesser ca. 40 mm) und breiteren Blättern findet sich in diesem Bereich mehr in Küstennähe. Sie erreicht in Kultur eine Wuchshöhe von 60 - 80 cm. Bei der Varietät interior handelt es sich um eine Inlandsform, die kleinwüchsiger ist, kleinere Blütenkörbchen (Durchmesser ca. 26 mm) und schmalere, weniger gezähnte Blätter ausbildet. In Kultur erreicht sie eine Höhe von ca. 40 cm (s. Abb. 1). Die Zahl der pro Vegetationsperiode gebildeten Blütenkörbchen ist jedoch bedeutend größer als bei der Küstenvarietät, so daß in Kultur ein fast doppelt so hoher Blütenertrag erzielt werden kann (KATING und Mitarb., 1973; MAGUIRE, 1943).

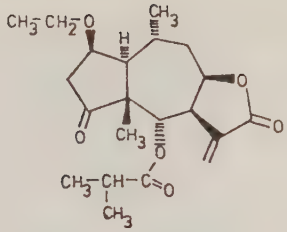
Abbildung 1: Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire Varietät interior in Kultur

Über die Inhaltsstoffe der Blütenkörbchen von A. chamissonis Less. liegen bisher nur spärliche Untersuchungen vor, wobei nicht immer zwischen den genannten Subspecies unterschieden wird. Die Blütenköpfchen führen 0,1 - 0,16 % ätherisches Öl (LUCKNER und Mitarb., 1965; GÜNTZEL und Mitarb., 1967; KATING und Mitarb., 1973), dessen Zusammensetzung von RINN (1970) in Ansätzen untersucht worden ist. Von den Flavonoiden wurden Astragalin, Luteolin und sein 7-Monoglucosid identifiziert (LUCKNER und Mitarb., 1965; BORKOWSKI und

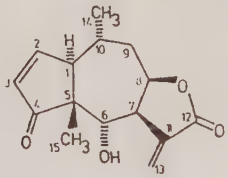
Mitarb., 1966). SCHULTE und Mitarb. (1969) konnten fünf Polyacetylene identifizieren und Luteolin, Thymol und Cholin nachweisen. Von KOWALEWSKI und Mitarb. (1969) wurden Kaffeesäure, Chlorogensäure und Cynarin gefunden.
Ende der 60iger Jahre konnte eine russische Arbeitsgruppe (RYBALKO und Mitarb., 1965; EVSTRATOVA und Mitarb., 1969) erstmals ein Sesquiterpenlacton in der Gattung Arnica nachweisen. Sie isolierten aus A. foliosa Nutt. (= A. chamissonis Less. subsp. foliosa (Nutt.) Maguire) ein Pseudoguaianolid, das sie Arnifolin nannten (s. Abb. 2). Diese für Asteraceen typischen Bitterstoffe wurden in der Folge auch in A. montana und A. longifolia gefunden. POPLAWSKI und Mitarb. (1971) isolierten aus den Blättern von A. montana Tetrahydrohelenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie dessen Essigsäure-, Isovaleriansäure-, Isobuttersäure- und Methacrylsäureester, die die Bezeichnung Arnicolide A bis D erhielten. LIST u. FRIEBEL (1974) isolierten anschließend aus den Blütenkörbchen Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinacetat. RÖTTGER (1981) konnte schließlich aus der Droge insgesamt 15 Pseudoguaianolide isolieren und identifizieren, bei denen es sich um Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie deren Essigsäure-, Isobuttersäure-, 2-Methylbuttersäure-, Isovaleriansäure-, Methacrylsäure- und Tiglinsäureester dieser beiden Verbindungen sowie um den Tetrahydrohelenalinisobuttersäureester und den 2β-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalinisobuttersäureester handelte. In den Blütenkörbchen von A. longifolia wurden von WILLUHN u. HERRMANN (1976, 1979) neben Helenalin, seinem Acetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat als Hauptkomponenten die



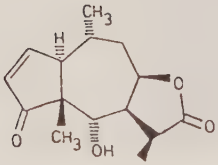
Arnifolin



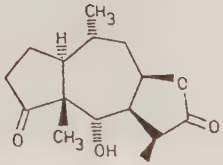
2ß-Ethoxy-2,3-dihydrohelenalin-isobuttersäureester



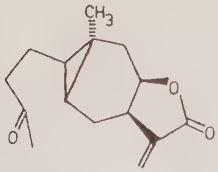
Helenalin



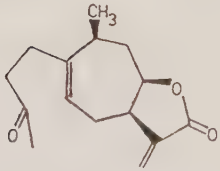
11,13-Dihydrohelenalin



Tetrahydrohelenalin



Carabron



Xanthalongin

Abbildung 2: Bisher in Arnica - Arten gefundene Sesquiterpenlactone. Helenalin und seine Dihydroderivate liegen auch verestert vor.

Xanthanolide Carabron und Xanthalongin identifiziert (s. Abb. 2).

Die erst in jüngster Zeit in Arnikablüten nachgewiesenen Sesquiterpenlactone Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie deren Derivate müssen nach neueren Untersuchungen als die wesentlichen Wirkstoffe der Droge angesehen werden (WILLUHN, 1981). Diese Verbindungen wirken cytotoxisch, antitumoral und antibiotisch (u.a. LEE und Mitarb., 1972, 1977a, 1977b; HLADON und Mitarb., 1975; HALL und Mitarb., 1977; OLECHNOWICZ u. STEPIEN, 1963; RÖTTGER, 1981); sie haben eine starke atemanaleptische Wirkung und sind herz- und kreislaufwirksam (LAMSON, 1913; LIST u. FRIEBEL, 1974; HERRMANN, 1978; RÖTTGER, 1981); sie steigern den Uterustonus und verstärken dessen periodische Kontraktionen (RYBALKO und Mitarb., 1965; HERRMANN, 1978); sie entfalten eine starke antiphlogistische und antihyperlipidämische Wirkung (HALL und Mitarb., 1979, 1980a, 1980b) und sind als das bisher unbekannt gewesene toxische Prinzip der Droge anzusehen (RÖTTGER, 1981; WITZEL und Mitarb., 1976; KIM, 1980). Schließlich sind diese Verbindungen für die bei äußerlicher Anwendung von Arnikapräparaten gelegentlich auftretenden, bekannten allergenen Kontaktdermatiden verantwortlich zu machen (HERRMANN und Mitarb., 1978; HAUSEN und Mitarb., 1978; HAUSEN, 1980).

WILLUHN u. HERRMANN (1979) konnten durch DC - Analyse zeigen, daß sich die Blütenkörbchen von A. chamissonis Less. in ihrer Sesquiterpenlactonführung deutlich von denen der A. montana - Blüten unterscheiden und Unterschiede im Sesquiterpenlacton - Komponentenspektrum auch bei den Unter-

arten von A. chamissonis Less. auftreten. Im DC der Blüten von A. chamissonis Less. subsp. genuina Maguire waren nur drei Sesquiterpenlactone nachweisbar, gegenüber sieben bei den A. montana - Blüten, wobei diese darüberhinaus nicht mit diesen identisch waren. Die klein- und großblütige Varietät der Unterart genuina, d.h. die Blüten der Varietäten interior und typica stimmten dagegen in ihrer Sesquiterpenlactonführung überein. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Isolierung und Identifizierung dieser Sesquiterpenlactone. Gleichzeitig soll durch erste pharmakologische Tests geprüft werden, ob diese Verbindungen dieselben oder ähnliche Wirkungen entfalten wie die in A. montana - Blüten auftretenden Helenanolide, was für den Einsatz der Blüten dieser Unterart von A. chamissonis als Austauschdroge für die offizinellen A. montana - Blüten von grundlegender Bedeutung ist.

II. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone

1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Sesquiterpenlactonen (Sl*) in den Blütenkörbchen von A. chamissonis subsp. genuina Maguire

In Anlehnung an WILLUHN u. HERRMANN (1978) wurden aus jeweils 10 g getrockneten und gemahlenen Blütenkörbchen der groß- und kleinblütigen Varietät von A. chamissonis subsp. genuina ein mit Sl angereicherter Extrakt gewonnen und auf Kieselgel - Folien mit n-Pentan/Ether (32 : 68) aufgetrennt. Zum Vergleich wurde ein auf dieselbe Weise aus A. montana - Blüten erhaltener Sl - Extrakt mitchromatographiert. Die Detektion erfolgte im UV - Licht (254 nm) und durch Besprühen mit Hydroxylamin/$FeCl_3$, Anisaldehyd/H_2SO_4 sowie ZIMMERMANN - Reagenz. Wie Abbildung 3 zeigt, ließen sich im Sl - Extrakt der A. montana - Blüten sieben im UV - Licht hellblau fluoreszierende, hydroxamat- und ZIMMERMANN - positive, sich mit Anisaldehyd/H_2SO_4 gelb färbende Komponenten nachweisen, bei denen es sich um die von RÖTTGER (1981) identifizierten Helenanolide handelt. Das Komponentenspektrum der A. chamissonis - Blüten unterschied sich hiervon deutlich, wobei das der beiden Va-

---

*Im Folgenden wird für die Sesquiterpenlactone die Abkürzung Sl verwendet, für dünnschichtchromatographisch und Dünnschichtchromatographie die Abkürzung dc bzw. DC, für säulenchromatographisch und Säulenchromatographie sc bzw. SC, für gaschromatographisch und Gaschromatographie gc bzw. GC, für relative Retentionszeit die Abkürzung RT.

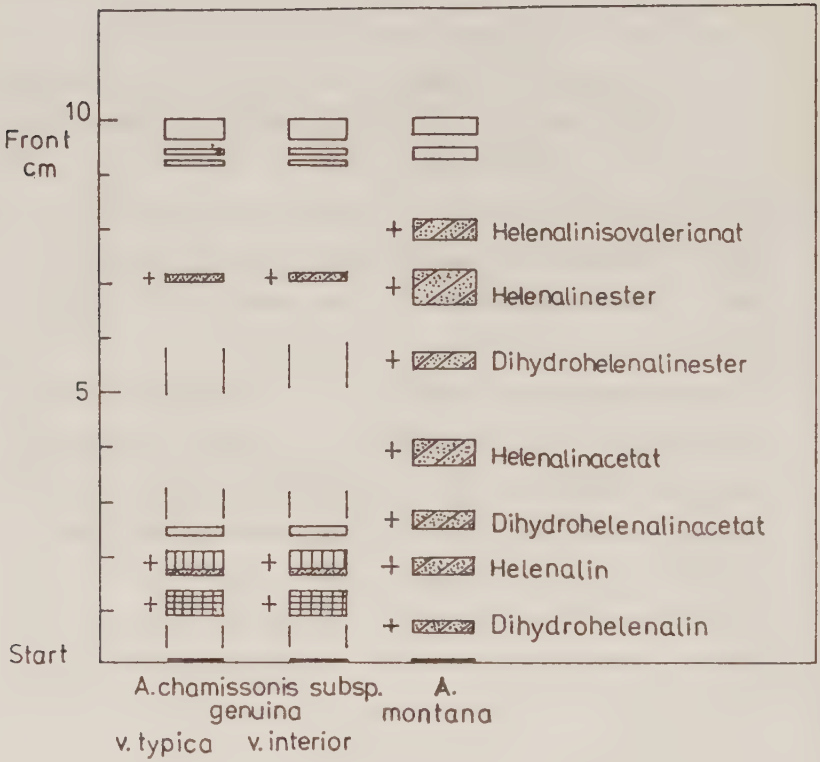


Abbildung 3: DC der Sesquiterpenlacton - Extrakte aus den Blüten von A. chamissonis ssp. genuina var. typica und interior sowie A. montana

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}; System: n-Pentan/Ether (32 : 68)
Detektion:

UV bei 254 nm	▭	bzw. | | (schwach)
Hydroxylamin/$FeCl_3$	+	
Anisaldehyd/H_2SO_4	▨	gelb ▦ lila
	▦	braun
ZIMMERMANN - Reagenz	▩	violett

rietäten jedoch identisch war. Hier traten im unteren R_f - Bereich drei, das Chromatogramm bestimmende Fluoreszenzzonen auf. Eine sehr schwache Fluoreszenz konnte unterhalb dieser Komponenten sowie auf Höhe der 11,13-Dihydrohelenalin- und Helenalinester beobachtet werden. Mit ZIMMERMANN - Reagenz färbten sich von diesen Fluoreszenzzonen lediglich die auf Höhe von Helenalin und der Helenalinester liegenden Komponenten schwach lila. Mit dem Hydroxylamin/$FeCl_3$ - Reagenz, das zum Nachweis von Lactonen geeignet ist, reagierten nur die beiden unteren der drei dominierenden Fluoreszenzzonen und die mit den Helenalinestern auf einer Höhe liegende Komponente, so daß nur hier das Vorliegen von Sesquiterpenlactonen vermutet werden konnte. Die obere Komponente reagierte mit Anisaldehyd/H_2SO_4 wie die Helenalinester unter Gelbfärbung, während die beiden Hauptkomponenten mit diesem Reagenz eine dunkelbraune (hR_f 11) bzw. eine kräftige lila Färbung (hR_f 16) ergaben.

2. Extraktion der Sesquiterpenlactone und Fraktionierung des Extraktes

Die Extraktion der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von A. chamissonis subsp. genuina erfolgte unter Ausnutzung der amphiphilen Eigenschaften dieser Stoffgruppe in Anlehnung an die Isolierungsmethode von POPLAWSKI und Mitarb. (1971). 1,78 kg getrocknete und pulverisierte Droge wurde mit Benzol im Soxhletverfahren erschöpfend extrahiert, der eingeengte Extrakt mit 60 %igem Ethanol ausgezogen und nach Abdampfen des Ethanols die wässrige Phase intensiv mit Chloroform aus-

geschüttelt (s. Exp. Teil S. 87). Der dunkelbraune, zähflüssige Rückstand der Chloroformausschüttelung (19,4 g) wurde mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5 : 4 : 1 : 2) über eine Säule mit 1,2 kg Alumina WOELM N Super I filtriert (HERRMANN, 1978). Danach lagen 8,77 g (= 0,49 % vom Blütentrockengew.) einer grüngelben, hochviskosen Fraktion vor, deren Komponentenspektrum im DC mit dem in Abbildung 3, S. 10 wiedergegebenen übereinstimmte.

Durch Erhöhung des Etheranteils in dem verwendeten Fließmittel auf 95 Volumenteile (d.h. n-Pentan/Ether = 5 : 95) konnte eine bessere Auftrennung des Extraktes erreicht werden. Mit diesem Trennsystem waren in der Fraktion fünf hydroxamatpositive Verbindungen nachweisbar, die in der Abbildung 4 mit A bis E bezeichnet wurden. Zusätzlich konnte eine sehr schwache, nicht genau abgrenzbare Braunfärbung im hR_f - Bereich 10 bis 20 beobachtet werden. Alle fünf Komponenten fluoreszierten im UV - Licht (254 nm) hellblau. Bei Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 färbten sich die Komponenten A und C schwach gelb, die Substanzen B, D und E lila, rotviolett bzw. schmutzigbraun. Mit ZIMMERMANN - Reagenz reagierten nur die Substanzen A und C unter schwacher Violettfärbung. Die hR_f - Werte der fünf potentiellen Sl - Komponenten und ihre Anfärbung mit den genannten Detektionsmitteln sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

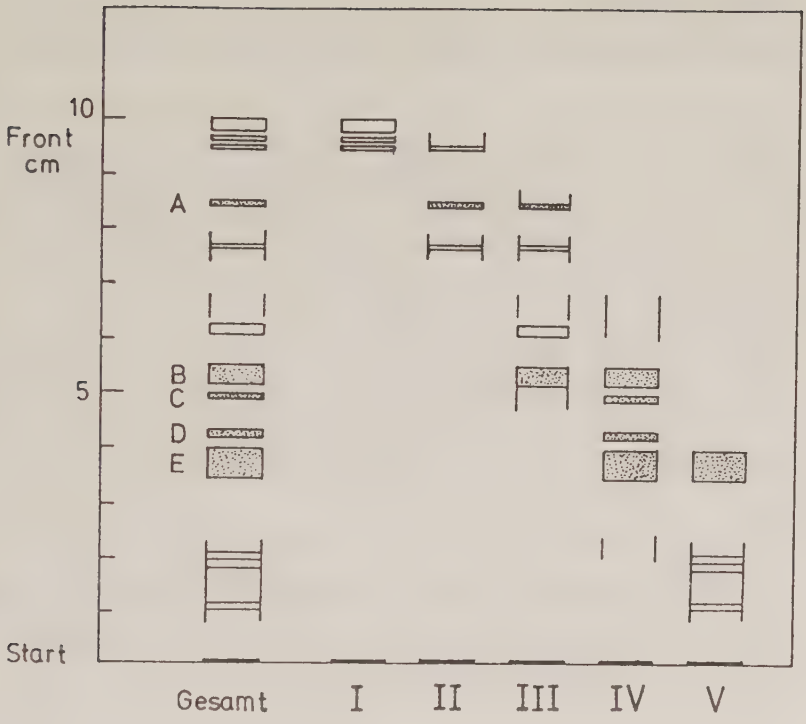


Abbildung 4: DC der Sesquiterpenlacton - Gesamtfraktion und der nach sc Auftrennung erhaltenen Teilfraktionen I - V

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}; System: n-Pentan/Ether (5 : 95)
Detektion:

UV bei 254 nm: ▭ bzw. | | (schwach)

Hydroxamat positiv ▭

Tabelle 1: hR_f - Werte und Detektion der S1 - Komponenten in der S1 - Gesamtfraktion aus den Blüten von A. chamissonis subsp. genuina
Schicht: Kieselgel 60 F_{254}; System: n-Pentan/Ether (5 : 95)

Substanz	hR_f-Wert	Detektion			
		UV 254 nm	Hydroxylamin/$FeCl_3$	Anisaldehyd/H_2SO_4	Zimmermann-Reagenz
A	84	pos.	braun	(gelb)	violett
B	53	pos.	braun	lila	-
C	49	pos.	braun	(gelb)	violett
D	42	pos.	braun	rotviolett	-
E	37	pos.	braun	schmutzig-braun	-

Zur Isolierung der im DC nachgewiesenen fünf hydroxamatpositiven Substanzen wurde die Gesamtfraktion an 1 kg Kieselgel 60 (MERCK) mit n-Pentan/Ether (32 : 68) sc aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen nach dc Kontrolle zu fünf Teilfraktionen vereinigt (s. Exp. Teil S. 89). Die Zusammensetzung der Teilfraktionen ist aus Abbildung 4 ersichtlich. Die hydroxamatpositiven Verbindungen wurden durch wiederholte SC aus den Teilfraktionen II und IV isoliert.

3. Isolierung und Strukturaufklärung der Substanz E (Chamissonolid)

Die Teilfraktion IV (2,64 g) mit den vier hydroxamatpositiven Substanzen (s. Abb. 4) wurde an 425 g Alumina WOELM N Super I sc mit Ethylacetat/Ether (50 : 50) aufgetrennt. Hierbei wurden die beiden Komponenten mit den höheren R_f - Werten

gemeinsam abgetrennt. Die anschließende Elution mit Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol (5 : 4 : 1 : 2) führte zu einer Fraktion, in der die beiden im DC tiefer liegenden, hydroxamatpositiven Substanzen gemeinsam anfielen (s. Exp. Teil S. 90).

Nach Einengung des Ethylacetat/Ether - Eluats fielen beim Stehenlassen im Kühlschrank nadelförmige Kristalle aus. Diese wurden abgenutscht und wiederholt aus Ethanol abs. umkristallisiert. Auf diese Weise wurden 910 mg (= 0,05 % vom Blütentrockengew.) farblose Kristalle erhalten, die in mehreren DC - Systemen einheitlich waren. Nach Laufhöhe und Farbreaktion mit den verwendeten Detektionsmitteln handelte es sich bei den Kristallen um Substanz E (hR_f 37) des abgebildeten Chromatogramms der S1 - Gesamtfraktion (s. Abb. 4 und Tab.1).

Die Substanz schmolz bei 202 - 203,5 °C und hatte eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20}$ = + 54,8° ($CHCl_3$). Das Massenspektrum (s. Abb. 5) zeigte den Molekülpeak bei M^+ = 324. In Ver-

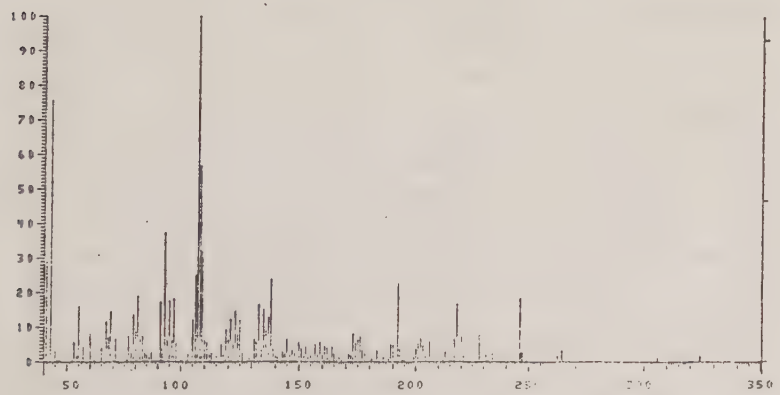


Abbildung 5: Massenspektrum der Substanz E (Chamissonolid)

bindung mit der CH - Analyse ergab sich die Summenformel $C_{17}H_{24}O_6$. Das im Massenspektrum auftretende Fragment m/z 264 dürfte aus Abspaltung einer Essigsäure (M^+ - 60) bzw. aus der Abspaltung der Acetylgruppe und Wasser resultieren, wobei der Acetylrest mit der Masse m/z 43 als zweitstärkstes Bruchstück im Spektrum auftritt. Basispeak ist ein Fragment mit der Masse m/z 107. Die Summenformel und diese Fragmentierung stehen im Einklang mit dem Vorliegen eines Sesquiterpenlactonessigsäureesters, der zusätzlich noch zwei weitere Sauerstofffunktionen trägt. Ein mit geringer Intensität bei m/z 306 (M^+ - 18) auftretendes Spaltprodukt deutet darauf hin, daß zumindest eine dieser beiden Sauerstoffunktionen als Hydroxylgruppe vorliegt, die als Wasser abgespalten wird.
Das UV - Spektrum zeigte ein Absorptionsmaximum bei 205,8 nm (ϵ = 11.167), dessen Lage für das Vorliegen einer Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe des Lactonrings spricht (DEUL u. GEISSMAN, 1957).

Tabelle 2: Physikalische Konstanten der Substanz E (Chamissonolid)

Molekülpeak	M^+ = 324
CH - Analyse	Gef.: C: 63,17; H: 7,50; O: 29,32 Ber.: C: 62,92; H: 7,41; O: 29,62
Summenformel	$C_{17}H_{24}O_6$
Schmelzpunkt	202 - 203,5 °C
$[\alpha]_D^{20}$	+ 54,8° ($CHCl_3$, c = 1,113)
UV - Spektrum λ_{max}	205,8 nm, ϵ = 11.167

Im IR - Spektrum (s. Abb. 6) erschienen die Signale für die Exomethylengruppe bei 812, 1270, 1658 und 3090 cm^{-1} und die Bande der Ketogruppe am γ - Lactonring bei 1760 cm^{-1}. Die Absorption bei 1725 cm^{-1} ist der bereits aus der Summenformel und dem Massenspektrum zu folgernden Acetatgruppierung zuzuordnen. Bei 3460 und 3380 cm^{-1} traten zwei Banden auf, die auf das Vorliegen von zwei freien Hydroxylgruppen schließen ließen. Nach Acetylierung der Substanz zeigte das Massenspektrum einen Molekülpeak bei M^+ = 408, wodurch das Vorliegen von zwei freien, acetylierbaren OH - Gruppen bestätigt wird.

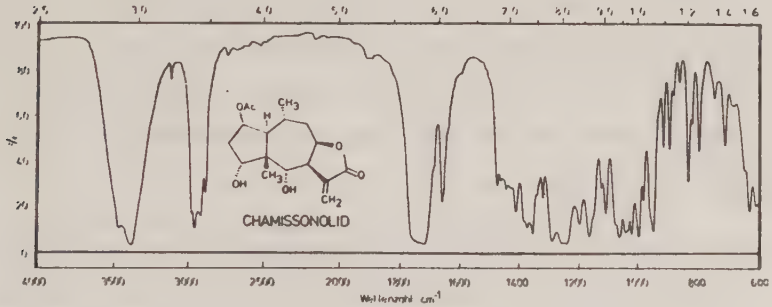


Abbildung 6: IR - Spektrum der Substanz E (Chamissonolid)

Nach Summenformel, MS -, UV - und IR - Spektrum handelt es sich somit bei der isolierten Verbindung um ein mit Essigsäure verestertes Sesquiterpenlacton mit einem α,β - ungesättigten γ - Lactonring und zwei freien Hydroxylgruppen. Ein entsprechendes Sesquiterpenlacton mit den ermittelten physikalischen Konstanten konnte in der Literatur nicht gefunden werden, so daß es sich bei dieser Verbindung um einen neuen Naturstoff handelt.

Das mit dem 80 MHz - Gerät aufgenommene ^{1}H-NMR - Spektrum wies die Verbindung als ein Pseudoguaianolid aus. Die tertiäre Methylgruppe an C-5 erschien als Singulett bei 0,93 ppm, die sekundäre Methylgruppe an C-10 als Dublett bei 1,10 ppm. Ein weiteres Singulett bei 2,07 ppm belegte die Anwesenheit einer Acetylgruppe. Die Protonen der Exomethylengruppe am γ - Lactonring erschienen als zwei signifikante Dubletts bei 5,85 und 6,36 ppm. Die bei 3,18 ppm und im Bereich von 1,85 bis 1,96 ppm auftretenden Signale sollten von den beiden OH - Gruppen hervorgerufen werden, da diese Signale nach H/D - Austausch mit D_2O nicht mehr beobachtet werden konnten. Im Spektrum um 3,72 und 4,09 ppm zentrierte Resonanzsignale konnten den Protonen an denjenigen C - Atomen zugeordnet werden, die die freien OH - Gruppen tragen, da diese Signale nach Acetylierung der Verbindung ins tiefere Feld verschoben wurden.

Nach Angaben in der Literatur erscheint bei S1 mit einem C-7/C-8 verknüpften Lactonring das Signal für das Proton an C-7 als Multiplett im Bereich von 3 bis 4 ppm (POPLAWSKI und Mitarb., 1971; HOLUB und Mitarb., 1972; YOSHIOKA und Mitarb., 1973). Das im Spektrum bei 3,55 ppm auftretende Multiplett kann dem Proton an C-7 zugeordnet werden, da bei Einstrahlung auf dieses Signal die beiden Dubletts der Exomethylengruppe durch Aufhebung der Kopplungen von H-13a/H-7 und H-13b/H-7 zu Singuletts verändert wurden. Gleichzeitig vereinfachte sich ein bei 4,82 ppm liegendes Multiplett, bei dem es sich aufgrund der chemischen Ver-

schiebung um das Signal des Protons an C-8 handeln sollte, dessen vereinfachtes Signal danach nur noch durch Kopplung mit den beiden Protonen an C-9 zu interpretieren ist. Weiterhin wurde durch die Einstrahlung auf H-7 die chemische Verschiebung des Protons an C-6 bei 3,72 ppm lokalisiert. Da dieses Signal nach H/D - Austausch durch D_2O sich zum Dublett veränderte, sollte eine der beiden freien OH - Gruppen an C-6 gebunden sein. Die zweite OH - Gruppe und die Acetatgruppe müssen dagegen am Cyclopentanring des Pseudoguaianolids lokalisiert werden.

Da die Aufspaltungsmuster im 80 MHz - Spektrum keine sichere Zuordnung der Protonen und keine sichere Ermittlung der Kopplungskonstanten ermöglichten, wurde von der Verbindung ein 360 MHz - ^{1}H-NMR - Spektrum aufgenommen (s. Abb. 7). Entsprechend durchgeführte Entkopplungsexperimente bestätigten die bereits aus dem 80 MHz - Spektrum getroffene Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Protonensignale. Weitere Einstrahlungsexperimente führten zur Zuordnung der chemischen Verschiebungen für die Protonen des Cyclopentanringes (d.h. H-1, H-2, H-3a, H-3b und H-4), wie sie in Tabelle 3 wiedergegeben sind.

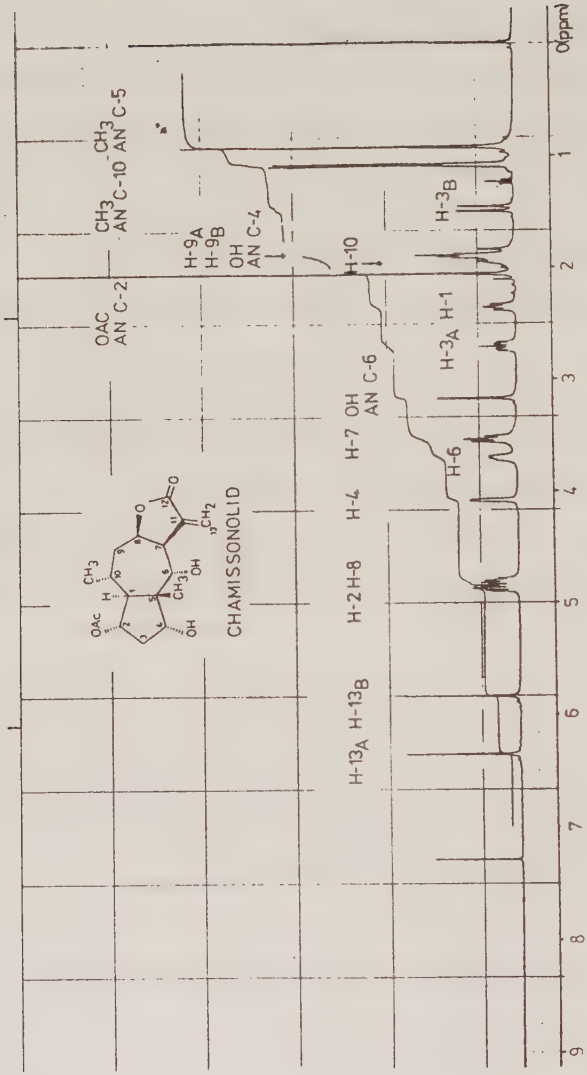


Abbildung 7: ^{1}H-NMR - Spektrum von Chamissonolid

Tabelle 3: ^{1}H-NMR - Verschiebungen (ppm, rel. zu TMS = 0) und Kopplungskonstanten J (Hz) von Chamissonolid in $CDCl_3$; s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

Protonen	ppm	J	Hz
1	2,366 dd	1,2	8,2
2	4,885 ddd	2,3a	9,2
3a	2,721 ddd	2,3b	3,0
3b	1,483 dd	3a,3b	(-)16,0
4	4,093 d	3a,4	5,5
6	3,716 d(breit)	6,7	10,2
7	3,548 m	7,8	8,0
8	4,823 ddd	10,-CH_3	6,8
9a	1,85 bis 2,12	7,13	2,0
9b	1,85 bis 2,12	13a,13b	<0,5
10	1,965 m		
13a	6,363 d		
13b	5,853 d		
CH_3 an C-5	0,933 s		
CH_3 an C-10	1,100 d		
OAc an C-2	2,075 s		
-OH an C-4	1,85 bis 1,96		
-OH an C-6	3,185 s(breit)		

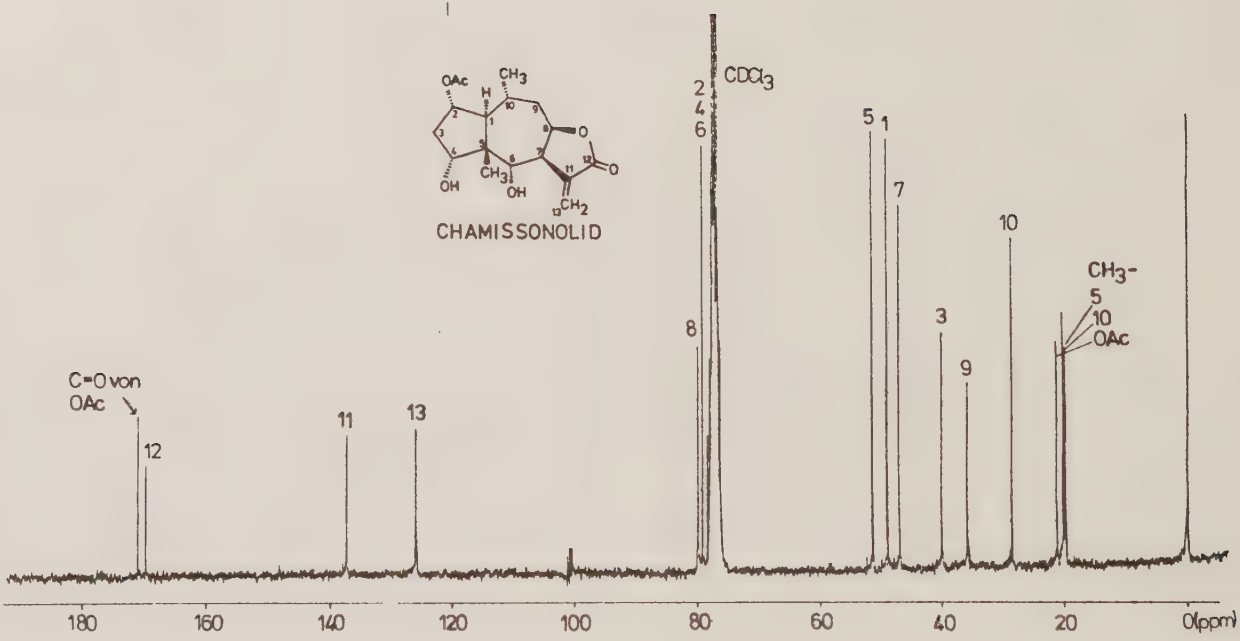


Abbildung 8: ^{13}C-NMR - Spektrum von Chamissonolid

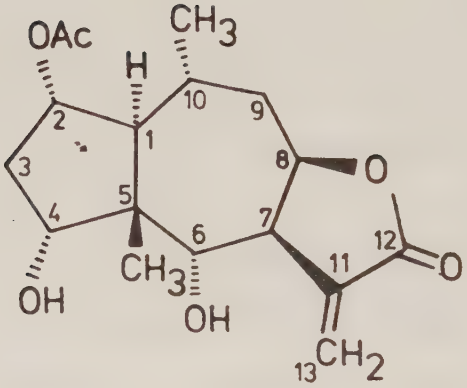
Das Proton mit der größeren Tieffeldverschiebung (4,885 ppm) muß an C-2 lokalisiert sein, das die Acetylgruppe trägt; sein Aufspaltungsmuster resultiert aus der Kopplung mit H-1 und den beiden H-3 - Protonen. Das Signal mit der chemischen Verschiebung von 4,093 ppm wird von dem Proton an C-4 hervorgerufen, an dem die zweite OH - Gruppe gebunden ist. Als Kopplungspartner für H-4 stehen hier nur die beiden H-3 Protonen zur Verfügung.

Die soweit ermittelte Struktur steht im Einklang mit den Signalen des ^{13}C-NMR - Spektrums der Verbindung (s. Abb. 8). Dies zeigt, daß die Verbindung 17 C - Atome besitzt, von denen 4 sp^2 - hybridisiert sind. Aus den "gated decoupling" - Experimenten ergaben sich folgende Atomsorten:

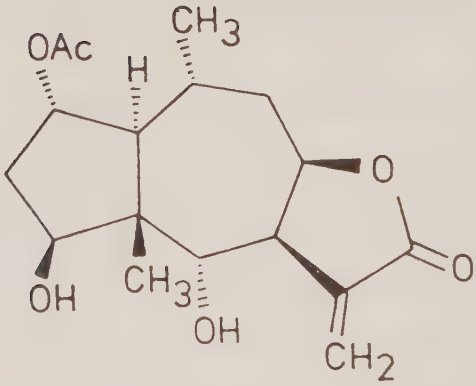
4 $-\overset{\backslash\ /}{C}-$, 7 CH, 3 CH_2 und 3 CH_3.

Weiterhin wurden 4 neben Sauerstoff befindliche tertiäre C - Atome ermittelt. Die Anwesenheit eines quartären C - Atoms neben Sauerstoff kann ausgeschlossen werden. Die Verbindung zeigt zudem eine OAc - Funktion bei 170,837 ppm. Die Shiftwerte der drei verbleibenden sp^2 - hybridisierten C - Atome sowie die Tatsache, daß eines von diesen geminalständige Wasserstoffe besitzt, legt die Anwesenheit eines α - Methylen - γ - lactons nahe. Tabelle 5, S. 33 gibt die Einzelzuordnung aller 17 C - Atome wieder.

Bei der isolierten Verbindung handelt es sich somit um ein Stereoisomeres von Picrohelenin, das aus Helenium autumnale isoliert wurde (KONDO und Mitarb., 1976, 1977) und sich bereits durch einen anderen Schmelzpunkt (170 °C) von der vorliegenden Verbindung unterscheidet (s. Abb. 9).



Chamissonolid



Picrohelenin

Abbildung 9: Strukturformeln von Chamissonolid und Picrohelenin

Zur Klärung der Stereochemie dieser neuen Substanz wurden weitere ^{1}H-NMR - spektroskopische Messungen vorgenommen. Aus biogenetischen Gründen kann angenommen werden, daß der Lactonring an C-7 β - verknüpft ist, wie dies für alle bisher bekann-

ten Pseudoguaianolide zutrifft. Die Kopplungskonstante der H-7/H-8 - Protonen zeigt einen Wert von 8,0 Hz, was für eine 7β, 8β - cis - Verknüpfung des Lactonringes spricht (HERRMANN und Mitarb., 1978), die auch bei allen anderen aus Arnica - Arten isolierten Sesquiterpenlactonen vorliegt (EVSTRATOVA und Mitarb., 1969; POPLAWSKI und Mitarb., 1971; HOLUB und Mitarb., 1972; LIST u. FRIEBEL, 1974; WILLUHN u. HERRMANN, 1976; RÖTTGER, 1981). Im Einklang hiermit steht weiterhin die unter 3 Hz liegende allylische Kopplung von H-7 mit den beiden Exo-methylenprotonen, die nach SAMEK (1970) auf eine cis - Verknüpfung des fünfgliedrigen α,β - ungesättigten - γ - Lactonringes hinweist. Die Einstrahlung auf die Methylgruppe an C-10 führte zu einer über 20 %igen Steigerung der Signalintensität von H-8. Aufgrund dieses Kern - Overhauser - Effektes ist die Methylgruppe an C-10 wie das Proton an C-8 α - ständig anzuordnen. Aus der relativ großen Kopplungskonstante von 10,2 Hz für die H-6/H-7 - Protonen ergibt sich eine trans - Stellung, was bedeutet, daß die OH - Gruppe wie beim Picrohelenin an C-6 α - ständig ist (KONDO und Mitarb., 1977).

Die für die neue Substanz ermittelten ^{1}H-NMR - Daten (s. Tab. 3) stimmen mit den für das stereoisomere Picrohelenin angegebenen überein, mit Ausnahme derjenigen für das Proton an C-4 (4,37 anstelle von 4,093 ppm) und die Methylgruppe an C-5 (1,10 anstelle von 0,933 ppm). Danach sollte sich die isolierte Verbindung von Picrohelenin nur durch die sterisch andere Stellung der Hydroxylgruppe an C-4 unterscheiden, d.h. sie muß hier α - ständig sein.

Diesem neuen Pseudoguaianolid kommt somit die in Abbildung 9 dargestellte Struktur und Konfiguration zu, für die wir den Namen Chamissonolid vorschlagen. Die Verbindung ist das Hauptsesquiterpenlacton der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire.

Da bekannt ist, daß sich auch bei Kenntnis der absoluten Konfiguration an C-1 und C-5 des Cyclopentanringes der Pseudoguaianolide aus den Kopplungskonstanten der Protonen an C-1, C-2, C-3 und C-4 keine zweifelsfreie Zuordnung der Stereochemie an C-2 und C-4 ableiten läßt (HERZ und Mitarb., 1969, 1980; vgl. auch GÜNTHER, 1973; WILLIAMS u. FLEMING, 1979), haben wir für die Absicherung der Konfigurationsbestimmung der Substituenten an C-2 und C-4 eine Röntgenstrukturanalyse der neuen Verbindung durchführen lassen.* Sie bestätigte die ^{1}H-NMR - spektroskopisch ermittelte Stereochemie. Die Acetoxygruppe an C-2 ist wie die Hydroxylgruppe an C-4 α - ständig. Die Verknüpfung der beiden Fünfringe mit dem Siebenring ist 7β, 8β - cis für den Lactonring und 1β, 5α - trans für den Cyclopentanring. Ein weiteres Merkmal der Molekülstruktur ist eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxylwasserstoff an C-6 und dem Sauerstoff der OH - Gruppe an C-4. Abbildung 10 gibt zwei Moleküle als Ausschnitt einer durch Wasserstoffbrücken gebildeten Molekülkette wieder.

---

*Herrn Professor Dr. D. Mootz und Herrn Dipl. Chemiker M. Wiebcke, Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.

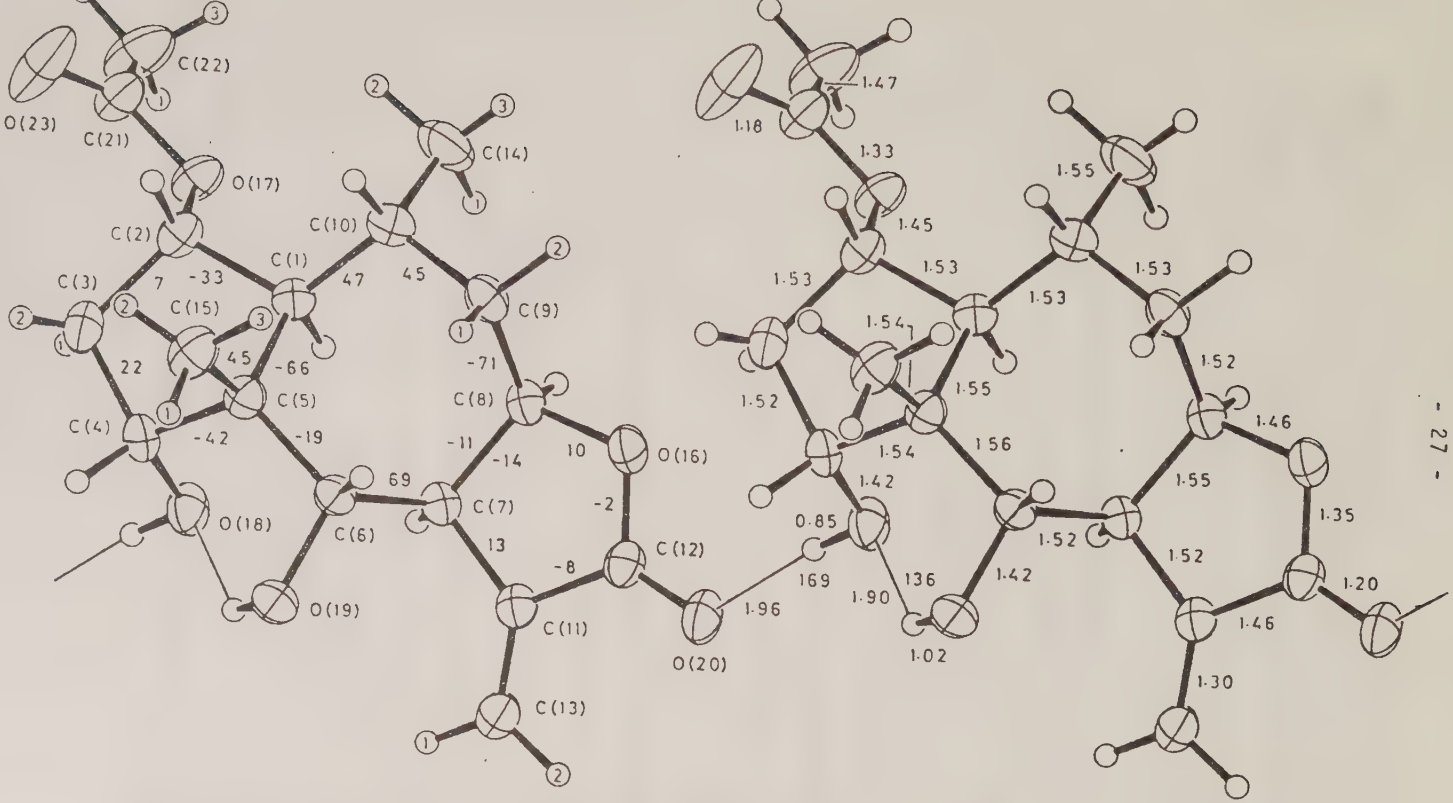


Abbildung 10: Röntgenstrukturanalyse von Chamissonolid; zwei Moleküle als Ausschnitt einer durch Wasserstoffbrückenbindung gebildeten Molekülkette

Die Konformation des Siebenringes wurde als verdrilltes Boot bestimmt; der Lactonring bildet einen Briefumschlag, während dem Cyclopentanring keine der beiden für einen Fünfring möglichen Konformationen, Briefumschlag oder Halbsessel, zugeordnet werden konnte.

4. Isolierung und Strukturaufklärung eines zweiten neuen Pseudoguaianolids: 6-Desoxychamissonolid (Substanz B)

Bei der sc Auftrennung der Teilfraktion IV fiel neben Chamissonolid eine Fraktion an, die die beiden hydroxamat-positiven Substanzen mit den hR_f - Werten 53 und 49 enthielt (s. Abb. 4, S. 13 und Tab. 1, S. 14). Die obere, mit Anisaldehyd/H_2SO_4 sich lila färbende Substanz bildete die Hauptkomponente; die dicht darunter liegende Substanz färbte sich gelb und zeigte zudem eine ZIMMERMANN - positive Reaktion. Nach erneuter SC dieser Fraktion an Aluminiumoxid mit Ethylacetat/Ether - Gemischen konnte die sich lila färbende Verbindung isoliert und durch wiederholtes Umkristallisieren aus Ethanol dc einheitlich gewonnen werden. Die farblosen Kristallnadeln (77,6 mg) schmolzen bei 204 - 206,5 °C und hatten eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +57{,}1^{\circ}$ (Chloroform).

Nach Massenspektrum ($M^+ = 308$; s. Abb. 11) und CH - Analyse ergibt sich für die isolierte Verbindung die Summenformel $C_{17}H_{24}O_5$. Das im Massenspektrum auftretende Fragment m/z 248 deutete auf die Abspaltung einer Essigsäure ($M^+ - 60$) bzw. einer Acetylgruppe (die bei m/z 43 als Fragment erscheint)

Tabelle 4: Physikalische Konstanten von 6-Desoxychamissonolid

Molekülpeak	M^+ = 308
CH - Analyse	Gef.: C: 65,69; H: 7,73; O: 26,58 Ber.: C: 66,23; H: 7,79; O: 25,97
Summenformel	$C_{17}H_{24}O_5$
Schmelzpunkt	204 - 206,5 °C
$[\alpha]_D^{20}$	+ 57,1° ($CHCl_3$, c = 1,160)
UV - Spektrum λ_{max}	212,8 nm, ϵ = 10.712

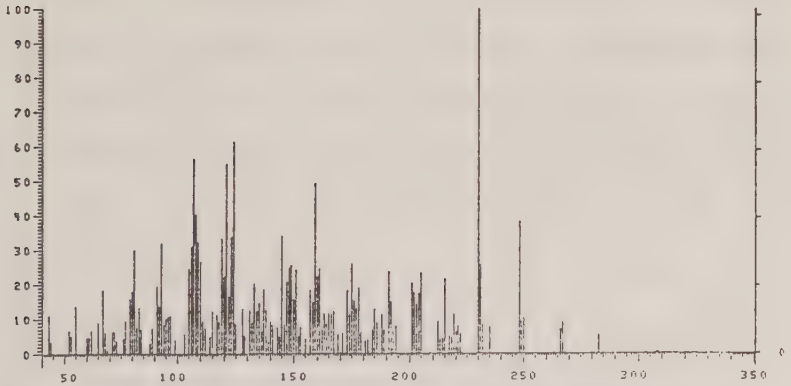


Abbildung 11: Massenspektrum von 6-Desoxychamissonolid

und Wasser hin. Den Basispeak bildet ein Fragment mit der Masse m/z 230, das durch Abspaltung von Wasser aus dem Fragment 248 resultieren dürfte (d.h. M^+ - [HAc + H_2O]). Danach sollte die Verbindung eine Acetylgruppe und eine freie

OH - Gruppe besitzen. Nach Acetylierung zeigte die Verbindung im Massenspektrum einen Molekülpeak bei $M^+ = 350$, wodurch das Vorliegen einer freien OH - Gruppe bestätigt wird.

Das UV - Absorptionsmaximum bei 212,8 nm ($\epsilon = 10.712$) deutete auch hier auf eine Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe am γ - Lactonring hin. Summenformel, Massenspektrum und UV - Spektrum sprachen dafür, daß es sich bei der Substanz um ein acetyliertes Sesquiterpenlacton handelt, das um eine OH - Gruppe ärmer ist als Chamissonolid.

Das IR - Spektrum (s. Abb. 12) zeigte dementsprechend die Signale für die Exomethylengruppe (812, 1270, 1658 und 3090 cm^{-1}), die Ketogruppe am γ - Lactonring (1735 cm^{-1}) und die Acetylgruppe (1720 cm^{-1}). Im Unterschied zu Chamissonolid trat hier jedoch das Signal für nur eine freie Hydroxylgruppe (3435 cm^{-1}) auf (vgl. Abb. 12 mit Abb. 6, S. 17), was mit der Summenformel in Einklang steht.

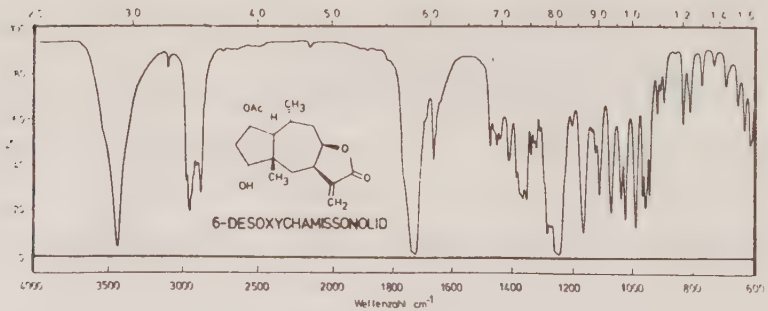


Abbildung 12: IR - Spektrum von 6-Desoxychamissonolid

Dem ^{13}C-NMR - Spektrum (s. Abb. 13) war zu entnehmen, daß die Substanz 17 C - Atome besitzt, von denen 4 sp^2 - hybridisiert sind. Aus den "gated decoupling" - Experimenten ergaben sich im Vergleich mit Chamissonolid folgende C - Atomsorten:

	6-Desoxychamissonolid	Chamissonolid
	4	4
CH	6	7
CH_2	4	3
CH_3	3	3

Die Anwesenheit eines quartären C - Atoms neben Sauerstoff kann ausgeschlossen werden. Weiterhin ermittelt man für die neue Verbindung nur 3 neben Sauerstoff befindliche tertiäre C - Atome, gegenüber 4 bei Chamissonolid. Beide Verbindungen besitzen eine OAc - Funktion. Danach muß die isolierte Substanz ein Desoxyderivat von Chamissonolid sein. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen beider Verbindungen (s. Tab. 5) zeigt, daß für ein CH neben Sauerstoff beim Chamissonolid (δ = 77.034 ppm) bei dieser Verbindung eine Ring - Methylengruppe steht, die eine chemische Verschiebung von δ = 42.359 ppm hervorruft. Das einzige sp^3 - hybridisierte quartäre C - Atom absorbiert bei 47.010 ppm und ist beim Chamissonolid um 5.550 ppm nach tieferem Feld verschoben.

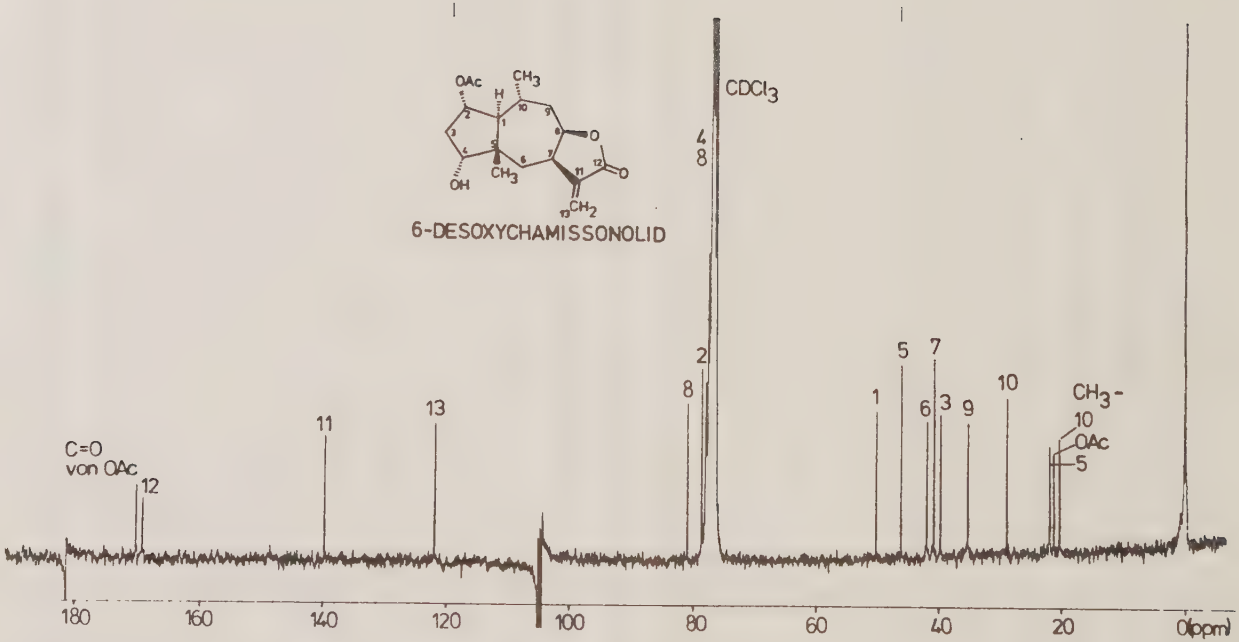


Abbildung 13: ^{13}C-NMR - Spektrum von 6-Desoxychamissonolid

Tabelle 5: ^{13}C - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid in Aceton-D_6

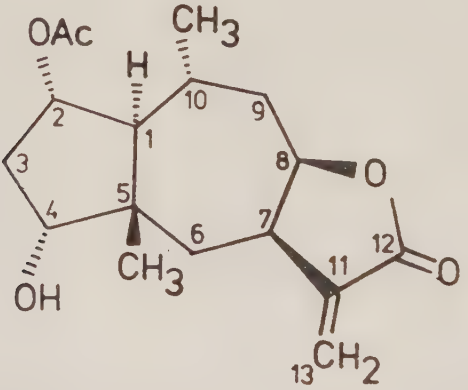
C-Atome	Chamissonolid	6-Desoxy-chamissonolid
1	49.710	51.070
2	80.050	79.478
3	40.994	40.590
4	77.846	77.524
5	52.560	47.010
6	77.034	42.359
7	47.622	41.449
8	80.580	80.773
9	36.885	36.176
10	---*	---**
11	138.724	142.461
12	170.174	169.023
13	125.534	121.518
CH_3 an C-5	19.950	22.241
CH_3 an C-10	20.613	20.792
CH_3 von OAc	21.210	21.247
CO von OAc	170.837	169.983

* unter Solvens-Septett fallend; Shiftwert in $CDCl_3$ = 28.580 ppm;

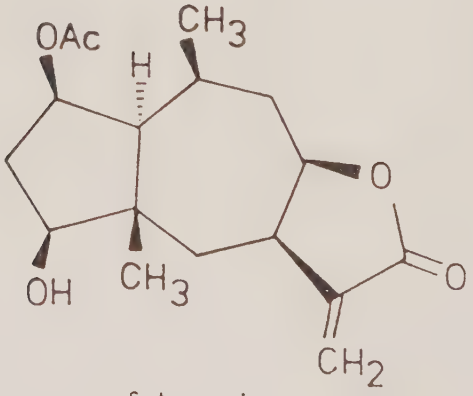
** unter Solvens-Septett fallend; Shiftwert in $CDCl_3$ = 28.930 ppm.

Das bedeutet, daß die isolierte Verbindung keine Hydroxylgruppe in Nachbarstellung zum quartären Kohlenstoff besitzt. Die OH - Gruppe an C-6 ruft beim Chamissonolid desgleichen auch auf C-7 einen ähnlichen β - Effekt von 6.173 ppm gegenüber dieser neuen isolierten Substanz hervor, woraus sich ergibt, daß diese das 6-Desoxyderivat von Chamissonolid sein

muß. Bei dem 6-Desoxyderivat ist im Vergleich zu Chamissonolid weiterhin C-11 um 3.737 ppm nach tieferem Feld verschoben, während für C-13 eine Hochfeldverschiebung von 4.016 ppm resultiert. Die CH_3 - Gruppe an C-5 erfährt ebenfalls eine Tieffeldverschiebung von 2.291 ppm.



6 - Desoxychamissonolid



Stevin

Abbildung 14: Strukturformeln von 6-Desoxychamissonolid und Stevin

Bei der isolierten Substanz handelt es sich danach um ein Stereoisomeres von Stevin (s. Abb. 14), das aus Stevia rhombifolia H.B.K. isoliert wurde (RIOS und Mitarb., 1967), von dem sie sich aber bereits durch Schmelzpunkt und spezifische Drehung unterscheidet (Stevin: Schmp. 184 - 186 °C; $[\alpha]_D^{20} = + 161^o$).

Zur Bestätigung der Stereochemie der isolierten Verbindung als 6-Desoxyderivat von Chamissonolid wurden ^{1}H-NMR - spektroskopische Messungen durchgeführt. Auch die ^{1}H-NMR - Daten (s. Abb. 15 u. Tab. 6) zeigten, daß sich die isolierte Verbindung von Chamissonolid lediglich durch das Fehlen der OH - Gruppe an C-6 unterscheidet. Im Spektrum erscheinen die Signale für zwei Protonen an C-6 (H-6a = 1.95 bis 2.17 ppm; H-6b = 1.546 ppm). Die chemischen Verschiebungen, Aufspaltungsbilder und Kopplungskonstanten der übrigen Signale belegen die gleiche Konfiguration, wie sie beim Chamissonolid nachgewiesen wurde (vgl. Tab. 6 und Tab. 3, S. 21). Die α - Konfiguration der OH - Gruppe an C-4 ergibt sich zusätzlich aus dem ^{1}H-NMR - Signal des Protons an C-4, das hier als Dublett erscheint. Daraus darf abgeleitet werden, daß es sich in cis - Position zu der bereits aus biogenetischen Gründen als β - ständig anzusehenden Methylgruppe an C-5 befindet. Wäre es α - ständig (d.h. trans zur Methylgruppe an C-5), dann sollte daraus ein Dublett vom Dublett resultieren (YANAGITA und Mitarb., 1970a), bedingt durch die unterschiedlichen Kopplungskonstanten zu den beiden Protonen an C-3. Ist das Proton an C-4 jedoch β - ständig, wie beim 6-Desoxychamissonolid, so ist die Kopplung zu H-3b annähernd Null, da, wie sich am Dreiding - Modell demonstrieren läßt, die vicinalen Protonen

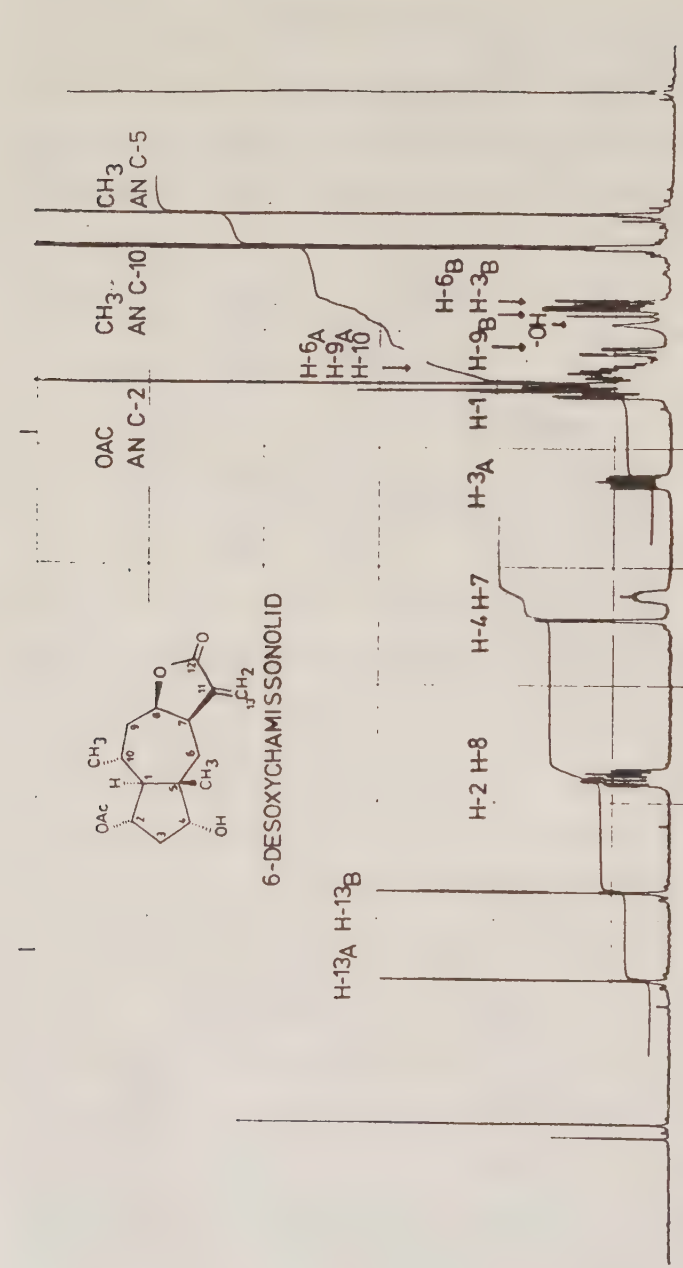


Abbildung 15: ^{1}H-NMR - Spektrum von 6-Desoxychamissonolid

Tabelle 6: ^{1}H-NMR - Verschiebungen (ppm, rel. zu TMS = 0) und Kopplungskonstanten J (Hz) von 6-Desoxychamissonolid in $CDCl_3$; s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

Protonen	ppm	J	Hz
1	2,158 dd	1,2	8,2
2	4,875 ddd	2,3a	9,2
3a	2,763 ddd	2,3b	3,0
3b	1,500 dd	3a,3b	(-)16,0
4	3,726 d	3a,4	5,1
6a	1,95 bis 2,17	6a, 6b	(-)14,5
6b	1,546 dd	6b,7	13,2
7	3,558 m	7,8	8,0
8	4,816 ddd	8,9a	8,8
9a	1,95 bis 2,17	8,9b	3,5
9b	1,841 dd (breit)	10,-CH_3	6,8
10	1,925 m	7,13	2,2
13a	6,275 d	13a,13b	<0,5
13b	5,665 d		
CH_3 an C-5	0,858 s		
CH_3 an C-10	1,100 d		
OAc an C-2	2,066 s		
-OH an C-4	1,645 s (breit)		

an C-3 einen rechten Diederwinkel bilden. Als Signal erscheint ein Dublett, das lediglich aus der Kopplung von H-4 und H-3a (J = 5,1 Hz) resultiert.
Nach diesen Untersuchungen kommt dem zweiten isolierten Pseudoguaianolid die in Abbildung 14, S. 34 wiedergegebene Struktur zu, für die wir den Namen 6-Desoxychamissonolid vorschlagen.

5. Isolierung und Identifizierung von Helenalin

Das bei der Isolierung von 6-Desoxychamissonolid (s.S. 28 ff.) anfallende zweite Sl (hR_f 49) konnte durch erneute, zweimalige SC der betreffenden Fraktion an Kieselgel 60 mit n-Pentan/Ether - Gemischen kristallin gewonnen werden (s. Exp. Teil S. 92). Nach Umkristallisation aus Ether wurden 8 mg farblose Kristalle dc einheitlich erhalten, die im Bereich von 162 - 168 °C schmolzen.
Das Massenspektrum der Verbindung (s. Abb. 16) zeigte den Molekülpeak bei M^+ = 262. In Verbindung mit der CH - Analyse ergab sich die Summenformel $C_{15}H_{18}O_4$. Fragmentpeaks bei m/z 95, 96, 122, 123 und 124 deuteten auf das Vorliegen eines Pseudoguaianolids mit Sauerstoffatomen an C-4, C-6 und C-8 hin und zeigten daneben das Fragmentierungsmuster von Helenalin (TSAI und Mitarb., 1969).
Das UV - Spektrum wies ein Maximum bei 219 nm (ϵ = 12.286) auf. Summenformel, Massenspektrum, Schmelzpunkt, UV - Absorptionsmaximum und molare Extinktion stimmten mit den Literaturwerten für Helenalin überein. Der daraufhin durchgeführte direkte dc und gc Vergleich mit authentischem Helenalin zeigte die Übereinstimmung mit dieser Verbindung.

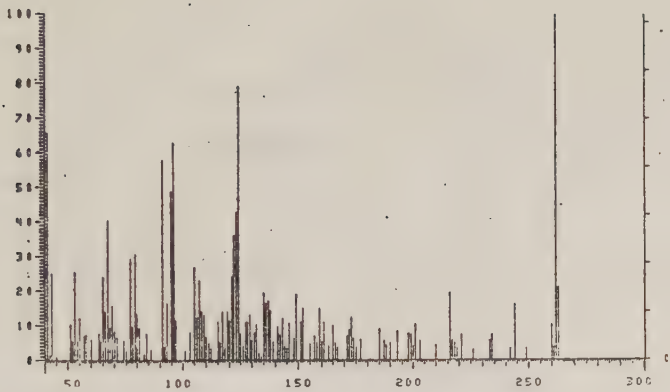
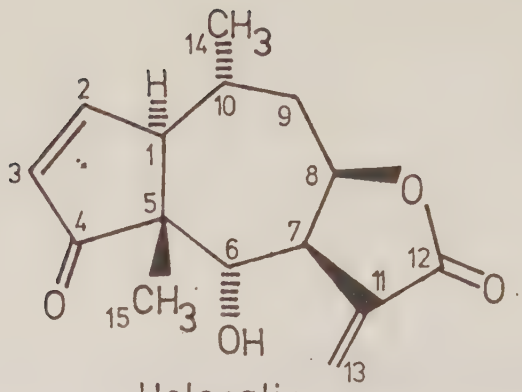


Abbildung 16: Massenspektrum von Helenalin

Tabelle 7: Physikalische Konstanten von Helenalin

	isolierte Substanz	Literaturwerte für Helenalin
Molekülpeak	$M^+ = 262$	$M^+ = 262$ [1]
CH - Analyse	Gef.: C: 68,21; H: 7,18; O: 24,61 Ber.: C: 68,68; H: 6,92; O: 24,40	
Summenformel	$C_{15}H_{18}O_4$	$C_{15}H_{18}O_4$ [1]
Schmelzpunkt	162 - 168 °C	164 - 169 °C [2]
UV - Spektrum λ_{max}	219 nm; ϵ = 12.286	220 nm; ϵ = 12.200 [1]

1) BOCHI u. ROSENTHAL (1956) 2) ADAMS u. HERZ (1949)



Helenalin

Die Identität der Substanz mit Helenalin wurde weiter durch das IR - und ^{1}H-NMR - Spektrum bestätigt (s. Abb. 17 und Abb. 18). Ersteres zeigte die Bande für die freie OH - Gruppe bei 3370 cm^{-1}, die Carbonylbande des Lactonrings bei 1755 cm^{-1} und die der Ketofunktion des Pentenonrings bei 1722 cm^{-1}. Bei 3105 cm^{-1} (sehr schwach), 1658 und 1270 cm^{-1} traten die Signale für die Exomethylengruppe am γ - Lactonring auf. Die Bande für die Doppelbindung im Pentenonring erschien bei 1575 cm^{-1}. Die Banden stimmten mit den u.a. von ADAMS u. HERZ (1949) und WILLUHN u. HERRMANN (1976) für Helenalin angegebenen überein.

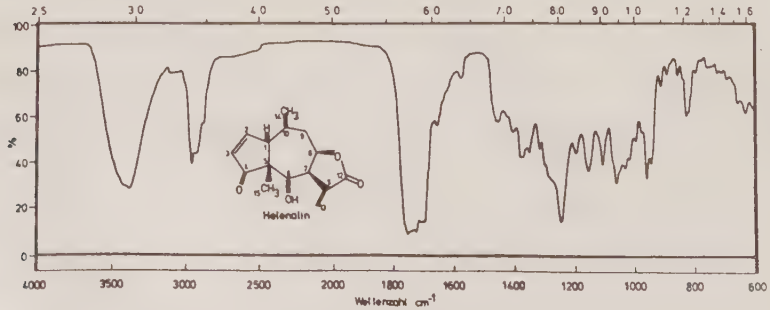


Abbildung 17: IR - Spektrum von Helenalin

Das ^{1}H-NMR - Spektrum (s. Abb. 18) war in allen Signalen mit den Literaturwerten für Helenalin (POPLAWSKI und Mitarb., 1971; WILLUHN u. HERRMANN, 1976; BOHLMANN und Mitarb., 1981) und mit einem Spektrum der authentischen Vergleichssubstanz identisch. Die Zuordnung der Signale ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

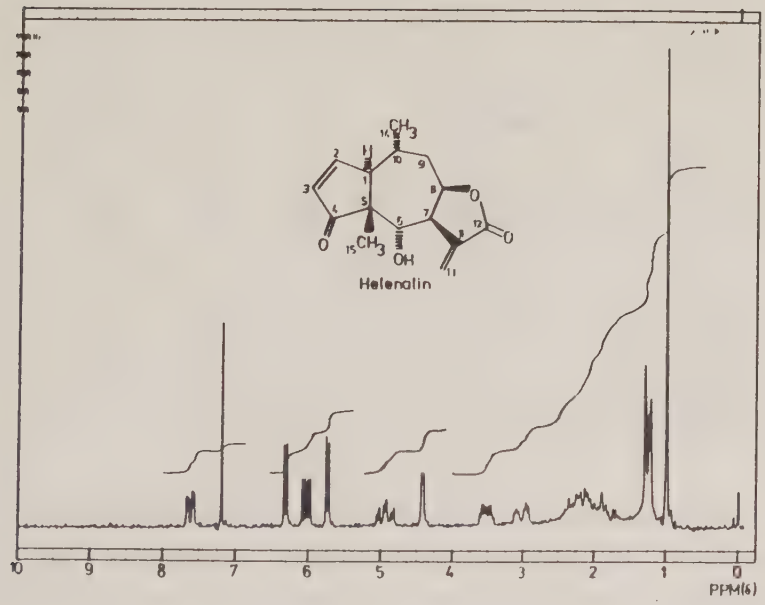


Abbildung 18: ^{1}H-NMR - Spektrum von Helenalin

Damit ist die isolierte Verbindung eindeutig als Helenalin identifiziert.

Tabelle 8: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) von Helenalin in $CDCl_3$ (80 MHz); s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

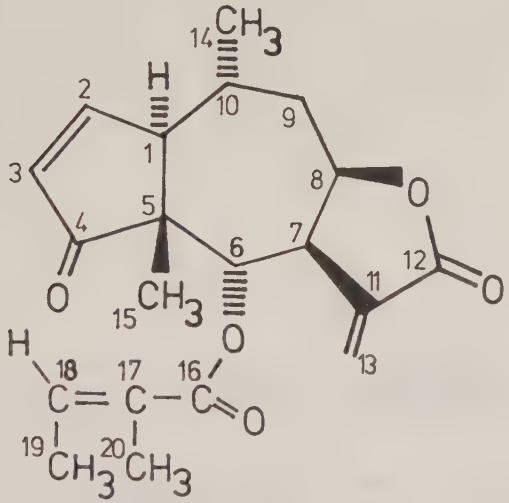
Protonen	isolierte Verbindung	Literaturwerte Helenalin[1)]
H - 1	3,07 ddd	3,03
H - 2	7,68 dd	7,65
H - 3	6,07 dd	6,06
H - 6	4,43 s (breit)	4,45
H - 7	3,54 m	3,57
H - 8	4,95 ddd	4,97
H - 9a	2,24 m	2,25
H - 9b	1,81 m	1,80
H - 10	2,09 m	2,05
H - 13a	6,33 d	6,36
H - 13b	5,74 d	5,79
CH_3 an C-5	1,00 s	0,98
CH_3 an C-10	1,25 d	1,26

1) POPLAWSKI und Mitarb., 1971

6. Isolierung und Identifizierung von Helenalintiglinat

Aus der stark viskosen, honigfarbenen Teilfraktion II (130 mg) wurde nach wiederholter SC an Kieselgel mit Benzol/Ether - Gemischen die hydroxamatpositive Substanz (hR_f = 84) in einer Ausbeute von 2 mg als weißer Niederschlag fast dc rein gewonnen (s. Exp. Teil S. 92). HR_f - Wert und Färbung mit den verwendeten Detektionsreagenzien (s. Tab. 1, S. 14) stimmten in vier DC - Systemen mit mitchromatographierten Helenalinestern (-isobutyrat, -methacrylat und -tiglinat) aus A. montana - Blüten überein.

Zur weiteren Identifizierung wurde die Substanz gc an einer OV-101 - und einer OV-1 - Glaskapillarsäule analysiert. Im GC erschien nur ein Peak, der durch Zumischen der genannten Helenalinester, die sich an diesen Säulen trennen lassen, als Helenalintiglinat identifiziert wurde.



Helenalintiglinat

Zur Absicherung des Ergebnisses der DC - und GC - Analysen wurde die isolierte Verbindung einer kombinierten GC/MS - Analyse im direkten Vergleich mit authentischem Helenalintiglinat an der OV-1 - Glaskapillarsäule unterworfen. Das Massenspektrum der Substanz (s. Abb. 19) stimmte mit dem Vergleichsspektrum vollständig überein. Es zeigte u.a. den Molekülpeak bei $M^+ = 344$, und als weitere charakteristische Bruchstücke für Helenalintiglinat die Fragmente m/z = 262

(M^+ - Tiglinsäure als Ketenderivat), m/z = 244 (M^+ - Tiglylrest mit H_2O) und den Basispeak bei m/z = 83, der in Verbindung mit der Masse m/z = 55 (Tiglylrest - CO) das Vorliegen dieser ungesättigten C_5 - Säure belegte (weitere Fragmente s. Exp. Teil).

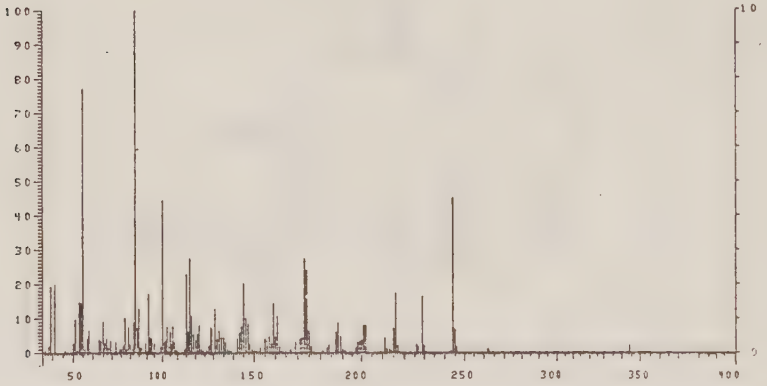


Abbildung 19: Massenspektrum von Helenalintiglinat

Helenalintiglinat wurde kurz zuvor als Naturstoff erstmals in Blüten von A. montana identifiziert (RÖTTGER, 1981).

7. Isolierung und Charakterisierung eines weiteren Sesquiterpenlactons

Bei der Isolierung von Chamissonolid aus der Teilfraktion IV (s.S. 14 ff.) konnte dc in der Mutterlauge eine weitere hydroxamatpositive Substanz nachgewiesen werden, die sich bei der Detektion mit Anisaldehyd/H_2SO_4 rotviolett färbte. Die Verbindung konnte nach zweimaliger SC an Kieselgel mit

n-Pentan/Ether (5 : 95) als Elutionsmittel und nach Umkristallisation aus Ether in einer Ausbeute von 11 mg dc rein gewonnen werden (hR_f 42; Substanz D des abgebildeten Chromatogramms, S. 13). Der Schmelzbereich lag zwischen 126,5 und 130,5 °C. Aus der CH - Analyse ergab sich in Verbindung mit dem Molekülpeak (M^+ = 248) des Massenspektrums (s. Abb. 20) die Summenformel $C_{15}H_{20}O_3$. Das erste Folgefragment bei m/z = 230 ($M^+ - H_2O$) deutete auf das Vorliegen einer freien Hydroxylgruppe hin. Es bildete den 100 % - Peak.

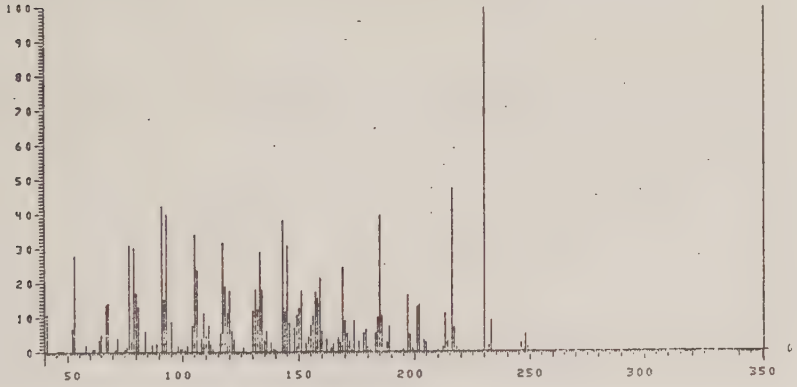


Abbildung 20: Massenspektrum des isolierten Sesquiterpenlactons

Das UV - Spektrum weist mit dem Absorptionsmaximum bei 211,5 nm (ϵ = 11.358) auf ein Sesquiterpenlacton mit einer Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe des Lactonrings hin (DEUL u. GEISSMAN, 1957).

Tabelle 9: Physikalische Konstanten des isolierten Sesquiterpenlactons

Molekülpeak	$M^+ = 248$
CH - Analyse	Gef.: C: 71,88; H: 8,16; O: 19,96 Ber.: C: 72,58; H: 8,06; O: 19,36
Summenformel	$C_{15}H_{20}O_3$
Schmelzbereich	126,5 bis 130,5 °C
UV - Spektrum λ_{max}	211,5 nm; ϵ = 11.358

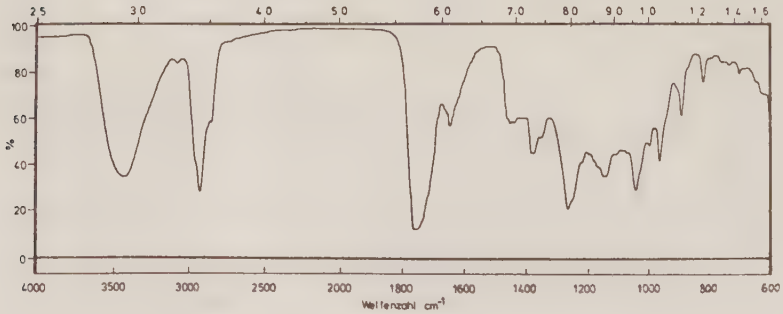


Abbildung 21: IR - Spektrum des isolierten Sesquiterpenlactons

Im IR - Spektrum (s. Abb. 21) tritt deutlich eine Bande für diese Exomethylengruppe bei 3090 cm^{-1} auf, die darüber hinaus durch die Signale bei 1660 (Schulter), 1265 und 820 cm^{-1} belegt wird. Bei 1753 cm^{-1} erscheint die Ketobande für die Carbonylfunktion am Lactonring und bei 3435 cm^{-1} tritt das Signal für eine freie Hydroxylgruppe auf. Außer der Exomethylengruppe am γ - Lactonring muß die Verbindung eine wei-

tere Doppelbindung tragen, wie aus der deutlichen Bande bei 1645 cm^{-1} hervorgeht.

Im ^{1}H-NMR - Spektrum (s. Abb. 22) erscheinen die Protonen der Exomethylengruppe am γ - Lactonring als zwei Dubletts bei 5.622 und 6.150 ppm. Das Singulett bei 0.842 ppm wird von einer tertiären Methylgruppe hervorgerufen. Ein Dublett für eine sekundäre Methylgruppe fehlt. Dafür treten zwei signifikante Dubletts bei 4.570 und 4.900 ppm auf, die aufgrund der chemischen Verschiebung und in Obereinstimmung mit dem IR - Spektrum nur von einer weiteren exocyclischen Methylengruppe hervorgerufen werden können. Das Signal der freien OH - Gruppe tritt bei 1.650 ppm auf, das nach Acetylierung nicht mehr beobachtet werden kann. Dafür wird von der Acetylgruppe ein deutliches Singulett bei 2.042 ppm hervorgerufen. Ein um 3.853 ppm zentriertes Signal kann nur von dem Proton herrühren, das die freie OH - Gruppe trägt, da es nach Acetylierung ins tiefere Feld verschoben wird (4.905 ppm). Einstrahlungsversuche auf dieses Multiplett zeigten, daß dieses Signal durch Resonanz mit vier Protonen zweier benachbarter Ring - Methylengruppen ($-CH_2-CHOH-CH_2-$) hervorgerufen wird, weshalb die Hydroxylgruppe an dem nicht den Lactonring tragenden Ring lokalisiert sein muß. Die Signale bei 3.010 und 4.530 ppm können wie bei den Chamissonoliden den beiden Protonen an den C - Atomen 7 und 8 zugeordnet werden, an denen der Lactonring wahrscheinlich 7β, 8β - cis - verknüpft sein muß. Für diese β - cisoide Stellung sprechen die chemische Verschiebung von H-8 bei 4.53 ppm, die Größe der Kopplungskonstante H-8/H-7 von 4,8 Hz, die bei einer trans - Ver-

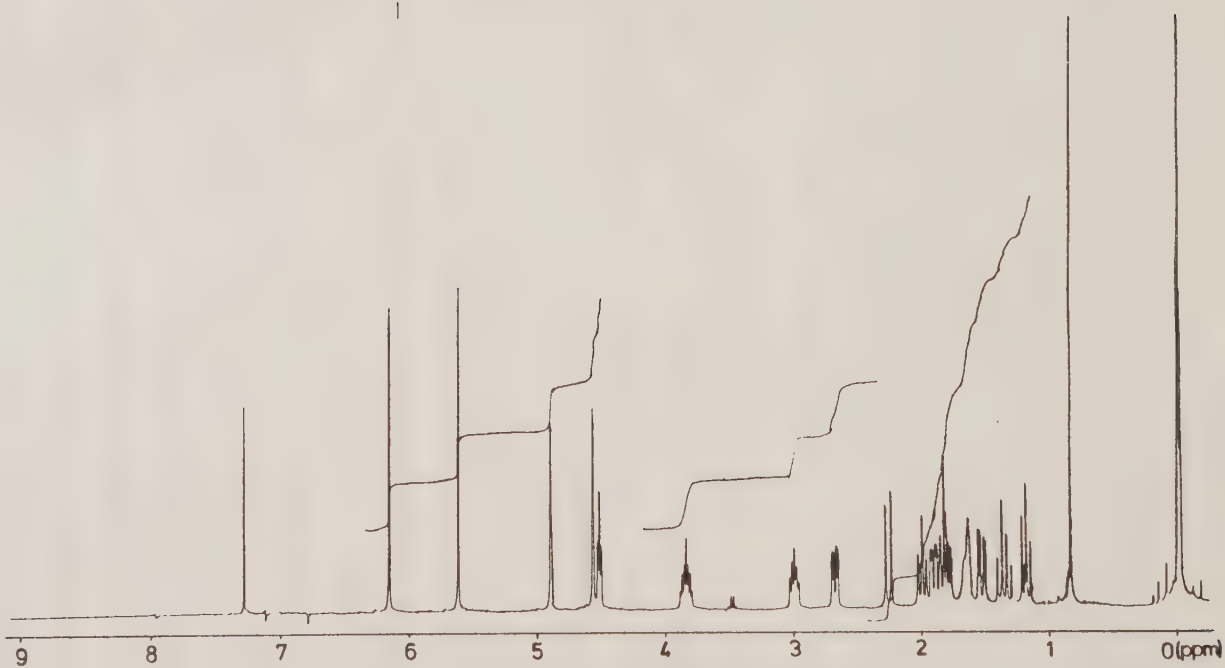


Abbildung 22: ^{1}H-NMR - Spektrum des isolierten Sesquiterpenlactons

knüpfung erheblich höher liegen würde, und die Größe der Kopplungskonstanten zwischen H-7 und den beiden Exomethylenprotonen an C-13 von etwa 2 Hz (SAMEK, 1970).
Weitere Entkopplungsexperimente führten zu der in Tabelle 10 aufgelisteten Zuordnung der Signale der Protonen an C-6 und C-9 unter Beibehaltung der Ringbezifferung der Pseudoguaianolide.
Aus den durch Einstrahlungsversuche ermittelten Signalen geht hervor, daß es sich bei dem isolierten S1 nicht um einen bisher aus Arnica - Arten isolierten Sesquiterpenlacton - Typ (Pseudoguaianolide oder Xanthanolide) handelt.

Gegen ein Pseudoguaianolid - Ringsystem, wie es bei den Chamissonoliden und Helenalinderivaten vorliegt, sprechen trotz vorhandener Ähnlichkeiten folgende Gründe:
1. Das Aufspaltungsmuster der Signale der beiden Protonen an C-6 kann nicht mit einem Pseudoguaianolid - Grundgerüst erklärt werden. Bei diesem könnten die Protonen an C-6 nur jeweils eine geminale Kopplung und eine Kopplung zu H-7 hervorrufen. Die Signale zeigen hier jedoch ein komplizierteres Aufspaltungsmuster, was nicht mit dem Pseudoguaianolid - Ringsystem in Einklang steht.
2. Die Kopplungskonstante der Protonen H-7/H-8 hat einen Wert von 4,8 Hz, die bei Pseudoguaianoliden mit einem 7β, 8β - cis - verknüpften Lactonring zwischen 7,1 und 8,8 Hz liegt und bei trans - Verknüpfung zwischen 9,6 und 11 Hz (YOSHIOKA und Mitarb., 1973; HERRMANN und Mitarb., 1978).

Tabelle 10: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Kopplungskonstanten J (Hz) des isolierten Sesquiterpenlactons in $CDCl_3$; s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

Protonen	ppm	J	Hz
X-1a	1,922 m	6a,6b	(-)13,5
X-1b	1,197 m	6a,7	7,0
X-2	3,853 m	6b,7	12,2
X-3a	2,688 m	7,8	4,8
X-3b	2,012 m	7,13	2,0
6a	1,86 bis 1,78 m	8,9a	1,7
6b	1,368 m	8,9b	4,9
7	3,010 m	9a,9b	(-)15,6
8	4,530 ddd		
9a	2,274 dd		
9b	1,543 dd		
13a	6,150 d		
13b	5,622 d		
14a	4,900 d		
14b	4,570 d		
tert. CH_3	0,842 s		
-OH an X-2	1,650 s (breit)		

Nach den durchgeführten Untersuchungen handelt es sich bei der isolierten Verbindung um ein tricyclisches Sesquiterpenlacton mit einer exocyclischen Methylengruppe am γ - Lactonring, der 7β, 8β - cis - verknüpft vorliegen dürfte. Zusätzlich trägt dieses S1 eine zweite Exomethylengruppe und eine freie OH - Gruppe an dem Ring, der nicht den Lactonring trägt. Es handelt sich bei dieser Substanz um ein Sesquiter-

penlacton mit einem Ringsystem, das bisher in Arnica - Arten noch nicht nachgewiesen worden ist. Die endgültige Strukturaufklärung der Verbindung muß durch weitere Analysen (^{13}C-NMR) nach Isolierung größerer Substanzmengen erfolgen.

III. Untersuchungen zur pharmakologischen Wirkung von Chamissonolid

1. Nachweis der sensibilisierenden Wirkung

Seit etwa 10 Jahren ist bekannt, daß Sesquiterpenlactone mit einer exocyclischen Methylengruppe am γ - Lactonring allergene Kontaktdermatiden hervorrufen können (u.a. MITCHELL, 1969; SCHULZ und Mitarb., 1975; EVANS u. SCHMIDT, 1980). Sie sind als Haptene anzusehen, die über die exocyclische Methylengruppe nach Art einer MICHAEL - Addition an SH-gruppentragende Proteine angelagert werden und so als Vollantigen zur Wirkung kommen (DUPOIS und Mitarb., 1974). In unserem Arbeitskreis konnte mit dem Epicutantest am Menschen und im Tierversuch an Meerschweinchen nachgewiesen werden, daß für die bekannten, durch Arnica montana - Blüten verursachten allergenen Kontaktdermatiden Helenalin und seine Ester verantwortlich zu machen sind (HERRMANN und Mitarb., 1978; HAUSEN und Mitarb., 1978; WILLUHN, 1981).
Chamissonolid, das in der vorliegenden Untersuchung als das dominierende Sesquiterpenlacton der Blüten von A. chamissonis subsp. genuina isoliert wurde, besitzt dieses für eine Sensibilisierung als notwendig angesehene immunologische Strukturelement. Da es in ausreichender Menge zur Verfügung stand,

wurde es im Tierversuch an Meerschweinchen auf seine allergene Eigenschaft untersucht*.

Zur Sensibilisierung wurden acht weiblichen Albino - Meerschweinchen (Pirbright white strain) täglich drei Wochen lang auf einem rasierten 2 cm^2 großen Areal der rechten hinteren Flanke mit einem Pinsel 0,05 ml einer 10 %igen Lösung von Chamissonolid in Aceton aufgetragen. In diesem Zeitraum konnte keine Erythembildung beobachtet werden. Weiteren fünf Albino - Meerschweinchen desselben Stamms wurden in demselben Zeitraum unter den gleichen Bedingungen nur 0,05 ml Aceton aufgetragen. Drei Wochen nach Abschluß der Sensibilisierung wurde den 13 Tieren eine 3 %ige acetonische Lösung von Chamissonolid mittels Epicutanpflaster im Nackenbereich aufgetragen und dort 24 Stunden lang belassen. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnte bei einem Meerschweinchen ein schwach ausgeprägtes Erythem festgestellt werden. Nach weiteren 24 Stunden zeigten fünf der acht sensibilisierten Meerschweinchen deutlich sichtbare Erytheme, wogegen die fünf Kontrolltiere keinerlei Reaktion aufwiesen. Eine toxische Reaktion konnte bei keinem der 13 Meerschweinchen beobachtet werden.

Nach diesen Untersuchungen ruft Chamissonolid die gleichen allergenen Kontaktdermatiden hervor, wie sie von den Helenalinderivaten in A. montana beschrieben wurden.

---

*Herrn Prof. Dr. G. Goerz, Hautklinik der Universität Düsseldorf, danke ich für die Durchführung der Tierversuche.

2. Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Chamissonolid

Die antimikrobielle Aktivität natürlich vorkommender, ungesättigter Lactone von einfacher chemischer Struktur ist in der Literatur wiederholt beschrieben worden. Auch von verschiedenen Sesquiterpenlactonen ist diese Wirkung bekannt (CAVALLITO u. HASKELL, 1946; HAYNES, 1948; OLECHNOWICZ u. STEPIEN, 1963; MITSCHER, 1975; LEE und Mitarb., 1977a).
Die bekannte antiseptische Wirkung der Blüten von A. montana kann im wesentlichen auf die antibiotische Wirkung von Helenalin, 11,13-Dihydrohelenalin und deren Ester zurückgeführt werden, die im Plattendiffusionstest in Konzentrationen von 10 bis 100 µg pro Filterrondelle (Ø 6 mm) Hemmhöfe zwischen 10 und 30 mm zeigten (RÜTTGER, 1981). Die im Reihenverdünnungstest bestimmten MHK - Werte lagen zwischen 10 und 100 µg / ml.
Vor diesem Hintergrund wurde auch Chamissonolid auf seine antimikrobielle Wirkung im Plattendiffusionstest untersucht. Die Testplatten wurden aus 15 ml Nährmedium unter Zusatz der Sporen-, Zell- oder Mycelsuspension einschichtig gegossen*. Die Filterpapierrondellen (Ø 6 mm) wurden mit der sesquiterpenlactonhaltigen Lösung getränkt und nach dem Trocknen auf die Testplatten gelegt. Die Hemmhöfe wurden, abhängig vom verwendeten Testorganismus, nach 12 bis 48 Stunden abgelesen.

---

*Herrn Dr. W. Quack, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Durchführung der Versuche.

Tabelle 11: Antimikrobielle Aktivität von Chamissonolid und Helenalin (in Klammer) gegen verschiedene Testorganismen im Plattendiffusionstest

Testorganismus	Stamm-Nr.	Hemmhofdurchmesser (mm) bei µg Sesquiterpenlacton/Filter		
		1	10	100
Eubacteriales, gram-pos.				
Bacillus brevis[1)]	9999[a)]	0 (0)	0 (14)	0 (33)
Bacillus stearothermoph.[1)]	12980[a)]	0 (0)	0 (0)	0 (18)
Bacillus subtilis[1)]	6633[a)]	0 (0)	0 (0)	0 (18)
Eubacteriales, gram-neg.				
Escherichia coli[1)]	10536[a)]	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Actinomycetales				
Streptomyces viridochrom.[1)]	3356[b)]	0 (0)	0 (0)	0 (14)
Ascomycetes (fadenförmig)				
Aspergillus perennis[3)]	12045[b)]	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ascomycetes (hefeartig)				
Saccharomyces cerevisiae[2)]	2978[a)]	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Basidiomycetes (hefeartig)				
Rhodotorula glutinis[2)]	6020[b)]	0 (0)	0 (0)	0 (0)

a) Herkunft: American Type Culture Collection

b) Herkunft: Centraalbureau for Schimmelcultures

1) Nährmedium A: Bacto Nutrient Broth (Difco Laboratories) 8 g, 1000 ml Wasser

2) Nährmedium B: Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories) 6,7 g, Glucose 4 g, Agar 15 g, 1000 ml Wasser

3) Nährmedium C: Malzextrakt (Fa. Dr. Fränkle & Max Eck, Fellbach) 20 g, Agar 15 g, 1000 ml Wasser

Im Gegensatz zu Helenalin aus A. montana zeigte Chamissonolid, das dominierende Sesquiterpenlacton aus den Blüten von A. chamissonis subsp. genuina, im Plattendiffusionstest bis zu einer Konzentration von 100 µg / Filterrondelle keine antibiotische Wirkung auf grampositive Bakterien und die getestete Streptomyces - Art.

3. Die Wirkung auf die Herztätigkeit

In der Literatur wird immer wieder von einem Einfluß auf Herz und Kreislauf bei innerlicher Anwendung von Arnikazubereitungen berichtet (vgl. u.a. STUHLFAUTH, 1938; THIES, 1943; FABER, 1953). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß hierfür die Helenalin- und Dihydrohelenalinderivate der Blüten verantwortlich zu machen sind, bei denen es sich um den beschriebenen "toxischen Herzstoff" handelt (LIST u. FRIEBEL, 1974; WILLUHN, 1981; RÖTTGER, 1981; vgl. auch LAMSON, 1913).
Aus diesem Grund sollte auch das in den Blüten von A. chamissonis subsp. genuina dominierende Pseudoguaianolid Chamissonolid auf eine Herzwirkung an Meerschweinchenvorhöfen und an der isolierten Herzmuskelfaser untersucht werden.

3.1. Untersuchung der Herzwirkung an der isolierten Muskelfaser*

Mit dieser Methode wird die ED_{50} einer Substanz ermittelt, die sich direkt auf die therapeutisch genutzte, positiv inotrope Wirkung bezieht. Die Messung erfolgt am isolierten, intakten

---

*Herrn Prof. Dr. M. Reiter, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, danke ich für die Durchführung der Untersuchung.

Papillarmuskel des Meerschweinchens oder der Katze durch Aufnahme der isometrischen, dosisabhängigen Kontraktionskurven. Hierbei wird durch stufenweise Erhöhung der Wirkstoffkonzentration die maximale Spannungsentwicklung (inotrope Wirkung) ermittelt. Man erhält hieraus eine Dosis - Wirkungskurve und damit die halbe maximale inotrope Wirkung (ED_{50} in Mol/l), wenn man die Zunahme der Kontraktionskraft in % der maximalen Kraftzunahme zur molaren Wirkstoffkonzentration in Relation setzt. Außerdem läßt sich am isolierten Papillarmuskel auch der zeitliche Verlauf der inotropen Wirkung und damit die durch eine Serum - Eiweißbindung unbeeinflußte Wirkungsgeschwindigkeit ermitteln.

Chamissonolid wurde mit dieser Methode auf seine Herzwirksamkeit am Meerschweinchen - Papillarmuskel untersucht. In Abbildung 23 sind die isometrischen Spannungskurven dieser Substanz im Vergleich zum Helenalinacetat unter stufenweiser Erhöhung der Wirkstoffkonzentration wiedergegeben.

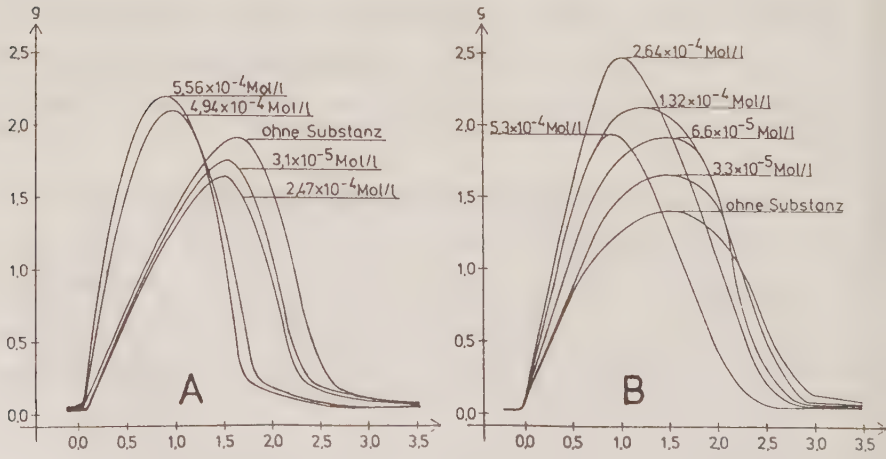


Abbildung 23: Wirkung von Chamissonolid (A) und Helenalinacetat (B) auf den isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens

Dabei zeigte sich eine biphasische Wirkung von Chamissonolid. Bei den niedrigen Dosen wurde zunächst eine negativ inotrope Wirkung beobachtet. Im Dosisbereich von $4{,}94 \times 10^{-4}$ molar und höher trat eine positiv inotrope Wirkung auf.

3.2. Die Wirkung von Chamissonolid auf den spontan schlagenden, rechten und den elektrisch gereizten, linken Meerschweinchenvorhof*

Die Untersuchungen wurden an zwei isolierten linken, elektrisch gereizten und zwei isolierten rechten Vorhöfen männlicher Meerschweinchen (Gewicht: 559 g und 520 g) durchgeführt. Die Organe wurden in ein mit KREBS-HENSELEIT - Lösung (KREBS u. HENSELEIT, 1932) gefülltes und mit Carbogen durchperltes Organbad eingebracht. Die Badtemperatur betrug 31 °C. Nach Anbringen eines Dehnungsmeßstreifens an den rechten Vorhöfen wurde die Kontraktionsamplitude über einen Direktschreiber registriert. Die linken Vorhöfe wurden auf eine Platin/Iridium - Elektrode gebunden und mit einer Frequenz von 1 Hz und 2,5-facher Schwellenstromstärke gereizt (60 Schläge / Min.). Die Kontraktionskraft wurde bei einer Vorbelastung von 1 g isometrisch über ein Statham-UC 2 - Element auf einem Direktschreiber registriert. In das Organbad wurde jeweils soviel

---

*Herrn Prof. Dr. Greef und Frau Taufik, Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Durchführung der Untersuchungen an den Meerschweinchenvorhöfen, an der narkotisierten Katze und am Kaninchendarm.

in 25 %igem Ethanol gelöstes Chamissonolid gegeben, daß hier eine $2{,}5x10^{-6}$, $2{,}5x10^{-5}$ und $5x10^{-5}$ molare Badendkonzentration erreicht wurde. Die Zugabe der Substanz erfolgte jeweils nach Einstellung eines stabilen Kontraktionsplateaus.
Die Zugabe der wässrig - ethanolischen Chamissonolid - Lösung führte zu einer schwachen negativ inotropen Wirkung an den Vorhöfen, die, wie in parallel durchgeführten Kontrollen gezeigt wurde, vollständig der Wirkung des Ethanols zugeschrieben werden mußte. Chamissonolid selbst hatte in der getesteten Konzentration keine Eigenwirkung auf die Meerschweinchenvorhöfe.
Darüber hinaus wurde der Effekt von Chamissonolid auf die positiv inotrope Wirkung von Orciprenalin an Meerschweinchenvorhöfen geprüft. Hier zeigte eine $5x10^{-5}$ molare Chamissonolid - Konzentration im Organbad keine Beeinflussung der positiv inotropen Wirkung von Orciprenalin ($3{,}16x10^{-6}$ molar).

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob Chamissonolid bei unterschiedlichen extracellulären Ca^{++} - Konzentrationen an Meerschweinchenvorhöfen eine Wirkung hervorruft. Hierbei wurde den Organbädern (KREBS-HENSELEIT - Lösung bzw. auch Lutrol - Glycerin - Wasser - Gemisch (BAYER) -) 1,2 bzw. 2,4 mM/l Ca^{++} zugefügt. Die Chamissonolid - Konzentration wurde kumulativ von $2{,}5x10^{-6}$ bis auf $3{,}16x10^{-4}$ Mol/l gesteigert. Auch bei diesen Versuchen konnte keine Beeinflussung der Vorhofkontraktionen durch Chamissonolid registriert werden.

4. Wirkung von Chamissonolid auf die glatte Muskulatur des Kaninchendarms

In der Literatur wird verschiedentlich von einer erregenden Wirkung der Blüten von A. montana auf den Uterus berichtet und auf den Mißbrauch der Pflanze als Abortivum hingewiesen (GEßNER, 1949; FABER, 1953).. RYBALKO und Mitarb. (1965) und EVSTRATOVA und Mitarb. (1969) konnten zeigen, daß das von ihnen aus A. chamissonis subsp. foliosa isolierte Pseudoguaianolid Arnifolin am Kaninchenuterus in situ eine Erhöhung des Tonus und eine Verstärkung der periodischen Kontraktionen bewirkt. HERRMANN (1978) konnte am isolierten Rattenuterus eine uteruskontrahierende Wirkung für 11,13-Dihydrohelenalinacetat nachweisen. Das isolierte Pseudoguaianolid Chamissonolid wurde deshalb auf seine spasmotorische Eigenschaft auf die glatte Muskulatur des Kaninchendünndarms geprüft.

Zur Versuchsdurchführung wurde ein Stück isolierter Kaninchendünndarm in einem Tyrode - Bad aufgespannt, das bei einer Badtemperatur von 37 ^{o}C mit Carbogen durchperlt wurde. (Tyrode - Lösung: NaCl: 136,9; KCl: 2,68; $CaCl_2$: 1,8; $NaHCO_3$: 11,9; NaH_2PO_4: 0,42; Glucose: 11,1 jeweils mMol/l)

Die isotonische Kontraktion des Darms wurde auf einen Schreibhebel übertragen und auf einem Kymographen registriert. Chamissonolid wurde in einem Lutrol - Glycerin - Wasser - Gemisch (BAYER) gelöst und unter schrittweiser Konzentrationssteigerung dem Organbad zugesetzt, bis hier eine $2x10^{-4}$ molare Badendkonzentration erreicht wurde. Es konnte keine spasmo-

torische Wirkung von Chamissonolid am isolierten Darmpräparat nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuch wurde der Effekt von Chamissonolid auf die spasmotorische Wirkung von Acetylcholin sowie auf die spasmolytische Wirkung von Papaverin am Kaninchendünndarm untersucht. Dazu wurden jeweils einem Organbad mit einer vorgelegten 2×10^{-4} molaren Chamissonolidkonzentration 0,1 µg/ml Acetylcholin bzw. 1 µg/ml Papaverin zugesetzt. Dies führte zu einer deutlichen Kontraktionszunahme bzw. -abnahme. Kontrollversuche ergaben für Acetylcholin bzw. Papaverin dieselben Kontraktionsveränderungen wie bei Anwesenheit von Chamissonolid im Organbad. Auch diese Versuche zeigten, daß Chamissonolid keine Wirkung auf die glatte Muskulatur des Kaninchendünndarms ausübt.

5. Test auf Beeinflussung der Atemfrequenz und -tiefe sowie des Blutdrucks durch Chamissonolid an narkotisierten Katzen

Wiederholt ist darüber berichtet worden, daß verschiedene Zubereitungen von A. montana - Blüten Atmung, Kreislauf und Blutdruck beeinflussen (u.a. GEßNER, 1949; FABER, 1953). LIST u. FRIEBEL (1974) sowie HERRMANN (1978) haben am Kaninchen bzw. an der Ratte eine beträchtliche Wirkung auf die Atmung für Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat nachweisen können. Die Substanzen riefen nach i.v. Applikation bereits in Dosen von 0,25 bis 0,45 mg/kg eine deutliche Atembeschleunigung (um ca. 35 %) hervor unter gleichzeitiger Verstärkung der Atemtiefe, gelegentlich jedoch auch unter Verflachung der Atemzüge. In allen Fällen resultierte jedoch eine

Vergrößerung des Atemminutenvolumens, d.h. es kam zu einer deutlichen Leistungssteigerung. Mit der atemanaleptischen Wirkung war beim Kaninchen eine kurzfristige Blutdrucksenkung auf nahezu die Hälfte des Ausgangswertes verbunden (von 115 / 83 auf 78 / 35 mmHg). Vor diesem Hintergrund sollte auch das Pseudoguaianolid Chamissonolid auf eine evtl. atemanaleptische und blutdrucksenkende Wirkung hin getestet werden.

Die Beeinflussung der Spontanatmung wurde an einer mit Chloralose - Uretan narkotisierten, männlichen Katze (3,27 kg) untersucht. Das in 60 %igem Ethanol gelöste Chamissonolid wurde i.v. mit einer Anfangsdosis von 0,3 mg/kg Katze appliziert, die dann langsam auf 1,0 mg/kg Katze gesteigert wurde. Bei dieser Dosis zeigte die Katze eine Beschleunigung der Atemfrequenz von 6 auf 12 Atemzüge pro Minute unter gleichzeitiger Verflachung der Atmung. Zusätzlich kam es zu einer kurzfristigen Blutdrucksenkung von 154 auf 70 mmHg systolisch und 113 auf 49 mmHg diastolisch. Die gleiche Menge appliziertes Lösungsmittel (Ethanol 60 %ig) rief im Kontrollversuch eine Blutdrucksenkung von 149 auf 117 mmHg systolisch und 107 auf 82 mmHg diastolisch hervor, so daß Chamissonolid an der gemessenen Blutdrucksenkung beteiligt ist.

In einem weiteren Versuch wurde Chamissonolid in einem Lutrol - Glycerin - Wasser - Gemisch (BAYER) gelöst, das selbst keine Wirkung auf den Blutdruck zeigte. Das sonst unter gleichen Bedingungen an einer weiblichen Katze (2,94 kg) i.v. applizierte Chamissonolid (1 mg/kg) bewirkte hier eine kurzfristige

Blutdrucksenkung von 147 auf 138 mmHg systolisch und 102 auf 92 mmHg diastolisch. Die Versuche ergaben, daß Chamissonolid in einer Dosis von 1 mg/kg Katze i.v. eine kurzfristige Blutdrucksenkung und eine Beschleunigung der Atemfrequenz unter Verflachung der Atmung bewirkt.

6. Prüfung der antiphlogistischen Wirkung von Chamissonolid

Eine der markantesten Wirkungen der A. montana - Blüten ist die antiphlogistische Aktivität, die den Sesquiterpenlactonen der Droge zugeschrieben werden kann (RÜTTGER, 1981; WILLUHN, 1981). Sesquiterpenlactone mit nucleophil angreifbaren Doppelbindungen zeigen eine signifikante Entzündungshemmung sowohl im Carrageeninödem - Modell als auch in der Adjuvans - induzierten Arthritis der Ratte (HALL und Mitarb., 1979). In vitro Untersuchungen mit Verbindungen dieser Art haben eine lysosomenstabilisierende Wirkung und einen hemmenden Effekt auf die Leukozytenmobilität belegt (HALL und Mitarb., 1980a).

Chamissonolid, das dominierende S1 der Blüten von A. chamissonis subsp. genuina, besitzt das für diese Wirkung entscheidende Strukturelement, den 7β, 8β - cisoiden Lactonring mit exocyclischer Methylengruppe. Es wurde deshalb auf seine antiphlogistische Aktivität geprüft.*

---

*Herrn Prof. Dr. F.H. Kemper, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Münster, danke ich für die Durchführung der Untersuchungen.

Die Untersuchung erfolgte am Dextran - Rattenpfotenödem - Modell unter Benutzung des Rattenpfoten - Meßgerätes an männlichen SPF - Ratten (Winkelmann, Borden). Zum Wirkungsvergleich wurden 11,13-Dihydrohelenalin und Phenylbutazon in die Untersuchungen mit einbezogen. Tabelle 12 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Tabelle 12: Antiphlogistische Wirkung von Chamissonolid im Modell des Dextran - Rattenpfotenödems
(jeweils 7,5 mg/kg Ratte i.p.; n = 5)

Substanz	Ödemhemmung in %
Chamissonolid	28 %
11,13-Dihydrohelenalin	34 %
Phenylbutazon	16 % (20 mg/kg: 31 %)

Chamissonolid zeigt in diesem Modell bei einer Dosierung von 7,5 mg/kg Ratte i.p. eine etwa gleich starke antiphlogistische Aktivität wie 11,13-Dihydrohelenalin, jedoch eine stärkere als das mitgetestete Phenylbutazon, mit dem dieselbe Ödemhemmung erst bei einer Konzentration von 20 mg/kg Ratte erreicht wird.

IV. Diskussion

Arnica chamissonis subsp. genuina wird heute vom DAB 7 - DDR und von der Sowjetrussischen Pharmakopoe als gleichwertige Stammpflanze neben A. montana für die "Flores Arnicae" zugelassen. Als wesentliche Wirkstoffe der von A. montana stammenden Blüten sind nach neueren Untersuchungen Sesquiterpenlactone vom Pseudoguaianolidtyp anzusehen, die als biologisch und pharmakologisch recht aktive Stoffgruppe für das empirische und in zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen festgestellte Wirkungsbild der Arnikablüten verantwortlich gemacht werden können (s. Einleitung). In den Blütenkörbchen von A. montana wurden die Pseudoguaianolide Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie eine Reihe von Estern dieser Verbindungen als maßgebende Wirkstoffe identifiziert und pharmakologisch untersucht (LIST u. FRIEBEL, 1974; HERRMANN, 1978; HALL und Mitarb., 1979, 1980a, 1980b; RÖTTGER, 1981). WILLUHN u. HERRMANN (1978) konnten erstmals durch DC - Analysen nachweisen, daß sich die Blütenkörbchen von A. chamissonis Less. subsp. genuina Maguire (= A. chamissonis Less. subsp. chamisssonis) in ihrer Sesquiterpenlactonführung grundlegend von denen der A. montana unterscheiden (s. Abb. 3, S. 10). Es stellt sich deshalb die Frage, ob diese Unterart von A. chamissonis Less. als gleichwertige offizinelle Austauschdroge geeignet ist.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Isolierung und Identifizierung der dc in dieser Unterart nachgewiesenen Sesquiterpenlactone. Es zeigte sich, daß es sich bei den beiden dominierenden Sesquiterpenlactonen dieser Unterart um

zwei neue Naturstoffe handelt, deren Struktur und Stereostruktur durch UV -, IR -, MS -, ^{1}H-NMR - und ^{13}C-NMR - Spektroskopie aufgeklärt werden konnte. Sie erhielten von uns die Bezeichnung Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid (s. Abb. 9, S. 24 und Abb. 14, S. 34), die Stereoisomere von Picrohelenin bzw. Stevin darstellen (KONDO und Mitarb., 1976, 1977; RIOS und Mitarb., 1967). Beim 6-Desoxychamissonolid dürfte es sich wahrscheinlich um das 2-O-Acetylderivat von Neopulchellin handeln (YAMAGITA und Mitarb., 1970b). Da aus den Kopplungskonstanten der Protonen am Cyclopentanring der Pseudoguaianolide in vielen Fällen eine zweifelsfreie stereochemische Zuordnung der Substituenten an C-2 und C-4 nicht möglich ist (HERZ und Mitarb., 1968, 1971; GÜNTHER, 1973), wurde von Chamissonolid eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt, die die angegebene Konfiguration bestätigte.

Der Vergleich der Kopplungskonstanten von Protonen des Cycloheptanringes mit den entsprechenden Werten bei Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin deutete daraufhin, daß der Cycloheptanring in den beiden Pseudoguaianoliden eine andere Konformation aufweist als bei Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin. Durch Vervollständigung der Röntgenstrukturanalyse konnten WIEBKE und Mitarb. (im Druck) zeigen, daß die isolierten Chamissonolide ein verdrilltes Boot als Siebenring besitzen, die aus A. montana isolierten Helenalinderivate dagegen einen verdrillten Sessel. Hierdurch ergibt sich im Falle der Chamissonolide ein recht flaches Ringsystem, während bei den Helenalinen der Lactonring stets zur Seite der Methylgruppe an

C-5 abgewinkelt ist. Es konnte gezeigt werden, daß dieselben Konformationen auch in Lösung vorliegen und man diese zukünftig aus den Größen der Kopplungskonstanten der vicinalen Protonen erschließen kann.

Neben diesen beiden dominierenden neuen Sesquiterpenlactonen konnten aus den Blüten die Pseudoguaianolide Helenalin und Helenalintiglinsäureester isoliert und identifiziert werden. Bei Helenalin und seinen Estern bzw. den entsprechenden 11,13-Dihydroverbindungen handelt es sich um den dominierenden Sesquiterpenlactontyp der Blüten von A. montana, der hier bei A. chamissonis subsp. genuina in nur äußerst geringen Mengen auftritt.

Darüber hinaus wurde ein weiteres Sesquiterpenlacton isoliert, bei dem es sich aufgrund der MS - und ^{1}H-NMR - spektroskopischen Daten weder um eine Verbindung aus der Gruppe der Pseudoguaianolide noch der Xanthanolide handelt, zu denen alle bisher bekannten Sesquiterpenlactone der Gattung Arnica gehören. Da über die Einordnung der Gattung Arnica in die Triben der großen Familie der Asteraceae keine Einigkeit besteht (HEROUT, 1971; BÖHLMANN u. ZDERO, 1972) und sich die Sesquiterpenlactone für taxonomische Probleme auf der Ebene der Gattungen und Triben dieser Familie als nützliche Merkmalsquelle erwiesen haben (u.a. HEGNAUER, 1964; HEROUT, 1966a, b, 1971; STELLINK u. SPITZNER, 1966; HERZ, 1968, 1973; HEROUT u. SORM, 1969; RODRIGUEZ und Mitarb., 1971) ist dieses unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten ein interessanter Befund. Eine Nachisolierung und Strukturaufklärung dieser Verbindung ist deshalb anzustreben.

Ein dc Vergleich der Blütenkörbchen und Blätter von A. chamissonis subsp. genuina zeigte, daß beide Organe in der qualitativen Sl - Führung übereinstimmen. Die beiden neuen Sl, Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid, konnten auch aus den Blättern isoliert und über ihre physikalischen Konstanten sowie UV - und IR - Spektren identifiziert werden.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß Helenalin und seine Derivate maßgeblich an den bekannten Arnikawirkungen beteiligt sind. Diese Verbindungen wirken cytotoxisch, antibiotisch und antitumoral, sie haben eine starke atemanaleptische Wirkung und sind herz- und kreislaufwirksam. Sie steigern den Uterustonus und verstärken dessen periodische Kontraktionen. Sie verursachen die bekannten allergenen Kontaktdermatiden und sind das toxische Prinzip der Droge (Literatur, s. Einleitung S. 7). Die vielfältigen Wirkungen von Helenalin und seinen Derivaten resultieren aus der Blockierung SH - gruppentragender Enzyme, an die diese Verbindungen nach Art einer MICHAEL - Reaktion angelagert werden. Als wesentliches Strukturelement für diese Alkylierung ist bei Helenalin die exocyclische Methylengruppe am γ - Lactonring und als zweites nukleophiles Zentrum der β - unsubstituierte Cyclopentenonring anzusehen. 11,13-Dihydrohelenalin besitzt nur dieses zweite nukleophile Zentrum, da hier die Exomethylengruppe am γ - Lactonring zur Methylgruppe reduziert ist.

Für die verschiedenen Wirkungen sind die beiden Alkylierungszentren von unterschiedlicher Bedeutung. So ist etwa für die antibiotische Wirkung der β - unsubstituierte Cyclopentenonring das wesentliche Strukturelement (LEE und Mitarb., 1977a; RÖTTGER, 1981), für die antiphlogistische Aktivität dagegen mehr die exocyclische Methylengruppe am γ - Lactonring (HALL und Mitarb., 1979). Darüber hinaus werden die einzelnen Wirkungen von zusätzlichen Substituenten und von der Konformation des Moleküls beeinflußt (u.a. HALL und Mitarb., 1979, 1980a).

Die beiden dominierenden S1 der Blüten von A. chamissonis subsp. genuina besitzen als einziges nukleophiles Zentrum die exocyclische Methylengruppe am γ - Lactonring. Sie unterscheiden sich hierin somit von Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin. Desweiteren besitzen sie eine andere Konformation des Siebenringes als diese Verbindungen. Da Helenalin und seine Ester hier nur in geringen Spuren auftreten, stellt sich die Frage, inwieweit die Wirkung dieser neuen S1 derjenigen der in A. montana enthaltenen S1 entspricht, d.h. inwieweit von den Blüten dieser Unterart von A. chamissonis Less. die gleiche Wirkung wie von den A. montana - Blüten erwartet werden kann. Aus diesem Grunde wurden erste pharmakologische Untersuchungen mit dem isolierten Chamissonolid in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen durchgeführt.

Sesquiterpenlactone mit einer exocyclischen Methylengruppe am γ - Lactonring sind in den letzten Jahren als Allergene erkannt worden, die für die von verschiedenen Asteraceen hervorgerufenen allergenen Kontaktdermatiden verantwortlich sind (MITCHELL, 1969; SCHULZ und Mitarb., 1975; EVANS u. SCHMIDT, 1980). Diese als Haptene anzusehenden Sl werden über die Exomethylengruppe an SH - gruppentragende Proteine angelagert und kommen so als Vollantigen zur Wirkung. HERRMANN und Mitarb. (1978) sowie HAUSEN und Mitarb. (1978) konnten zeigen, daß Helenalin und Helenalinacetat die sensibilisierenden Allergene der Arnikablüten sind. Chamissonolid besitzt ebenfalls dieses wesentliche immunologische Strukturelement. An mit Chamissonolid sensibilisierten Meerschweinchen konnten wir erwartungsgemäß auch eine allergenisierende Wirkung von Chamissonolid experimentell nachweisen, so daß auch bei Verwendung der Blüten von A. chamissonis mit dem gelegentlichen Auftreten von allergenen Kontaktdermatiden zu rechnen ist. Das Ergebnis zeigt erneut, daß die Anwesenheit einer Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe des Lactonringes für die immunologische Aktivität von Sesquiterpenlactonen verantwortlich ist.

RÜTTGER (1981) hat im Plattendiffusionstest (10 bis 100 µg / Rondelle) und im Reihenverdünnungstest die antibiotische Wirkung von Helenalin, Helenalinacetat und 11,13-Dihydrohelenalinacetat gegen verschiedene gram - positive Bakterien und gegen Streptomyces viridochromogenes nachgewiesen (vgl. auch LEE und Mitarb., 1977a). Die minimale Hemmkonzentra-

tion lag bei den getesteten Bakterien durchgehend unterhalb von 100 µg/ml, z.T. bei 10 - 20 µg/ml. Die Erfolge bei der äußerlichen Anwendung der Arnikatinktur als Wundantiseptikum und bakteriostatisches Mittel lassen sich durch die Helenalinderivate erklären, da örtlich hierbei die wirksamen Konzentrationen durchaus erreicht werden.

Bei Chamissonolid ließ sich jedoch im unter denselben Bedingungen durchgeführten Plattendiffusionstest bei keinem der getesteten Organismen bis zu einer Hemmkonzentration von 100 µg / Filterrondelle eine antibiotische Wirkung nachweisen (s. Tabelle 11, S. 54). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von LEE und Mitarb. (1977a) und RÜTTGER (1981), die zeigen, daß für die antimikrobielle Wirkung der β - unsubstituierte Cyclopentenonring das wesentliche Strukturelement ist. Daß jedoch auch die Exomethylengruppe am γ - Lactonring, wenn auch in wesentlich geringerem Maße, an der Wirkung beteiligt ist, zeigen die Ergebnisse von RÜTTGER (1981), der bei 11,13-Dihydrohelenalinacetat durchgehend eine etwas geringere antimikrobielle Wirkung als bei Helenalinacetat nachweisen konnte. Da bei Chamissonolid der β - unsubstituierte Cyclopentenonring fehlt, jedoch die exocyclische, nucleophil angreifbare Doppelbindung am Lactonring vorhanden ist, ist hier eine antibiotische Wirkung erst bei wesentlich höheren Wirkstoffkonzentrationen zu erwarten. Daraus kann eine geringere antiseptische Wirkung der Blüten von A. chamissonis subsp. genuina abgeleitet werden, als sie von den A. montana - Blüten bekannt ist.

In vielen älteren pharmakologischen Untersuchungen wird immer wieder von einer Beeinflussung von Herz, Blutdruck und Atmung bei innerlicher Anwendung von Arnika - Zubereitungen berichtet (PEYER, 1927; SCHULZ, 1929; SCHOENEMANN, 1938; FABER, 1953; GEßNER u. ORZECHOWSKI, 1974). Durch den Nachweis der Helenanolide in A. montana ist auch hierfür das stoffliche Prinzip gefunden worden. In in vivo Versuchen und in verschiedenen in vitro Modellen, so am Langendorff - Herzen, am rechten, spontan schlagenden und linken, elektrisch gereizten Meerschweinchen - Vorhof und am isolierten Meerschweinchen - Papillarmuskel, konnte für Helenalin und Helenalinacetat eine positiv inotrope Wirkung im Dosisbereich von 10^{-6} bis 10^{-4} molaren Lösungen nachgewiesen werden, wobei es bei längerer Einwirkung der Substanzen und bei höheren Konzentrationen zu einer Herzschädigung kommt (LAMSON, 1913; RÖTTGER, 1981, vgl. auch LIST u. FRIEBEL, 1974). Auch für die Pseudoguaianolide Tenulin und Parthenin ist eine herzschädigende Wirkung beschrieben worden (IVIE und Mitarb., 1975; SETH u. BHATIA, 1978), während HERRMANN (1978) für das Xanthanolid Carabron am isolierten Meerschweinchen - Vorhof eine positiv inotrope Wirkung fand.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von Chamissonolid am spontan schlagenden, rechten und am elektrisch gereizten, linken Meerschweinchen - Vorhof sowie am isolierten Meerschweinchen - Papillarmuskel getestet. In den Vorhof - Versuchen zeigte Chamissonolid im Gegensatz zu Helenalinacetat bei Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-4} molaren Lösungen keine Wirkung. Auch bei unterschiedlichen extrazellulären Ca^{++} -

Konzentrationen sowie auf die positiv inotrope Wirkung von Orciprenalin konnte in diesen Modellen keine Eigenwirkung von Chamissonolid nachgewiesen werden. Am isolierten Papillarmuskel zeigte Chamissonolid anders als Helenalinacetat eine biphasische Wirkung. Einer zunächst negativ inotropen Wirkung im Konzentrationsbereich von 10^{-5} molaren Lösungen folgte ab einer $4{,}94 \times 10^{-4}$ molaren Konzentration eine positiv inotrope Wirkung, während Helenalinacetat in diesem Modell eine einheitlich positiv inotrope Wirkung zeigt, die bei $5{,}3 \times 10^{-4}$ molaren Lösungen bereits ihr Maximum überschritten hat (s. Abb. 23, S. 56). Sowohl die Versuche am Vorhof als auch am isolierten Papillarmuskel zeigen, daß Chamissonolid nicht die gleiche Wirkung am Herzen ausübt wie die Sesquiterpenlactone der A. montana - Blüten.

LIST u. FRIEBEL (1974) konnten am Kaninchen nach i.v. Applikation von 0,3 mg Helenalin- bzw. 11,13-Dihydrohelenalinacetat pro kg Körpergewicht eine Steigerung der Atemfrequenz und -tiefe nachweisen. Bei Ratten induzierte eine Dosis von 0,45 mg Helenalin bzw. 0,25 mg Helenalinacetat / kg Körpergewicht i.v. eine Atemfrequenzzunahme um 35 %, bei gleichzeitiger Verstärkung der Atemtiefe um 43 % (HERRMANN, 1978). Beim Kaninchen war die atemanaleptische Wirkung mit einer kurzfristigen Blutdrucksenkung auf nahezu die Hälfte des Ausgangswertes verbunden, wobei der diastolische Druck stärker als der systolische Druck gesenkt wurde (LIST u. FRIEBEL, 1974).

Wir konnten für Chamissonolid an narkotisierten Katzen nach i.v. Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht eine Beschleunigung

der Atemfrequenz von 6 auf 12 Atemzüge pro Minute beobachten, wobei die Atmung stets verflachte. Gleichzeitig kam es auch hier zu einer kurzfristigen Blutdrucksenkung um 54 % systolisch und 56 % diastolisch (von 154 auf 70 bzw. 113 auf 49 mmHg). Unter Berücksichtigung der blutdrucksenkenden Eigenwirkung des Lösungsmittels Ethanol (60 %ig), das den Blutdruck systolisch um 21 %, diastolisch um 23 % senkte (von 149 auf 117 bzw. 107 auf 82 mmHg), kann dem Chamissonolid eine blutdrucksenkende Wirkung zugesprochen werden, die bei der erfolgten Dosierung den Blutdruck auf etwa zwei Drittel der Ausgangswerte reduziert. Bei Verwendung eines Lutrol - Glycerin - Wasser - Gemisches als Lösungsmittel, das keine Eigenwirkung auf den Blutdruck hat, wurde der Blutdruck bei derselben Chamissonolid - Konzentration (1 mg/kg, i.v.) kurzfristig systolisch nur um 6 % (von 147 auf 139 mmHg) und diastolisch um 10 % (von 102 auf 92 mmHg) gesenkt, was auf eine Verstärkung der Wirkung durch Alkohol hindeutet. Insgesamt weisen die durchgeführten Versuche darauf hin, daß Chamissonolid eine geringere atemanaleptische und blutdrucksenkende Wirkung hat als die Pseudoguaianolide Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinacetat.

Bei der Gabe von Arnikaextrakten kommt es zur Tonussteigerung des Uterus und zu vermehrten Kontraktionen (FABER, 1953). Eine spasmotorische Wirkung wurde von RYBALKO und Mitarb. (1965) und EVSTRATOVA und Mitarb. (1969) für das Pseudoguaianolid Arnifolin und von HERRMANN (1978) für Dihydrohelenalinacetat am Uterus nachgewiesen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt von Chamissonolid auf die glatte Muskulatur des isolierten Kaninchendünndarms getestet, wobei bis zu einer $2x10^{-4}$ molaren Badendkonzentration keine Wirkung durch Chamissonolid beobachtet werden konnte. Auch der spasmotorische Effekt von Acetylcholin und die spasmolytische Wirkung von Papaverin auf die glatte Muskulatur wurden durch Chamissonolid nicht beeinflußt. Chamissonolid scheint sich somit auch hinsichtlich der spasmotorischen Eigenschaften von den genannten Pseudoguaianoliden zu unterscheiden.

HALL und Mitarb. (1979) haben am Modell des Carrageenin - Rattenpfotenödems und der induzierten Adjuvans - Arthritis gezeigt, daß α - Methylen - γ - lacton - Sesquiterpene entzündungshemmend wirken. Die Sättigung der 11,13 - Methylengruppe oder ihre anderweitige Maskierung ist mit einem Aktivitätsverlust verbunden. Helenalin, das über dieses für die Wirkung wesentliche Strukturelement hinaus einen β - unsubstituierten Cyclopentenonring besitzt, erwies sich unter den getesteten 25 Verbindungen als die wirksamste. Die Sättigung der 2,3 - Doppelbindung führte in diesem Falle zu einer Reduzierung der Aktivität von Helenalin, so daß auch dieses nukleophile Zentrum an der antiphlogistischen Wirkung beteiligt ist. Aus den Untersuchungen ging weiter hervor, daß die antiphlogistische Wirkung der Sesquiterpenlactone mit einer exocyclischen Methylengruppe am γ -Lactonring auch durch strukturelle Unterschiede, wie Ringsystem, Konformation und funktionelle Gruppen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflußt wird.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die antiphlogistische Wirkung des Pseudoguaianolids Chamissonolid, das den 7β, 8β - cisoiden Lactonring mit exocyclischer Methylengruppe als wirksames Strukturelement besitzt, jedoch im Vergleich zu den Helenalinderivaten der A. montana - Blüten eine andere Konformation im Siebenring aufweist, am Dextran induzierten Rattenpfotenödem getestet. Die Verbindung führte bei einer Dosierung von 7,5 mg/kg Ratte i.p. zu einer Ödemhemmung von 28 %. Sie war damit mehr als doppelt so wirksam wie Phenylbutazon und etwa gleich wirksam wie 11,13-Dihydrohelenalin, die beide zum Wirkungsvergleich mitgetestet wurden (s. Tab. 12, S. 63). Aus dem Vergleich der von HALL und Mitarb. (1979) für Helenalin, 2,3-Dihydrohelenalin und 11,13-Dihydrohelenalin ermittelten antiphlogistischen Aktivität am Carrageenin induzierten Rattenpfotenödem (Ödemhemmung bei 5 mg/kg Ratte, i.p.: Helenalin 72 %; 2,3-Dihydrohelenalin 49 %; 11,13-Dihydrohelenalin 11 %; Tetrahydrohelenalin keine Wirkung; Phenylbutazon, 100 mg/kg Ratte, i.p.: 47 %), kann vermutet werden, daß die Konformation des Siebenringes als verdrillter Sessel (wie bei Helenalin) für die antiphlogistische Wirkung günstiger ist als die eines verdrillten Boots (wie bei Chamissonolid), da andernfalls eine etwa gleich starke Wirkung wie bei 2,3-Dihydrohelenalin hätte erwartet werden dürfen. Chamissonolid besitzt, wie bereits aus der Struktur zu erwarten war, eine wesentlich geringere antiphlogistische Wirkung als Helenalin. Unter der Voraussetzung, daß auch die Helenalinester eine ähnlich starke Wirkung wie freies Helenalin entfalten und der Sesquiterpenlactongehalt in den

Blüten beider Arnica - Arten etwa gleich hoch ist, ist mit einer geringeren antiphlogistischen Wirksamkeit der Blüten von A. chamissonis subsp. genuina im Vergleich zu den A. montana - Blüten zu rechnen.

Die Analyse der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire hat gezeigt, daß es sich bei den beiden dominierenden Sesquiterpenlactonen um zwei von uns als Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid bezeichnete neue Sesquiterpenlactone handelt, deren pharmakologisches Wirkungsspektrum von den Sesquiterpenlactonen der offizinellen A. montana - Blüten abweicht. Helenalin und dessen Derivate, die für A. montana - Blüten typischen Sesquiterpenlactone, treten hier nur in Spuren auf. Aufgrund dieser unterschiedlichen Sesquiterpenlactone, die als wesentliche Wirkstoffe der offizinellen Arnikablüten anzusehen sind, ist mit einer unterschiedlichen Wirkung der beiden Blütendrogen zu rechnen. Eine Zulassung von A. chamissonis Less. als gleichwertige Stammpflanze für die offizinellen "Arnicae flos", wie sie im 2. AB der DDR bereits erfolgt ist, sollte deshalb die Unterart genuina Maguire (= A. chamissonis Less. subsp. chamissonis Maguire) ausschließen und sich gegebenenfalls auf die Unterart foliosa (Nutt.) Maguire beschränken, deren Sesquiterpenlactonführung nach den bisher vorliegenden Untersuchungen (WILLUHN u. HERRMANN, 1978; WILLUHN u. KRESKEN, 1981) mehr derjenigen der A. montana - Blüten gleicht.

V. Zusammenfassung

1. Aus den Blütenkörbchen der nordamerikanischen Wiesenarnika, Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire (= A. chamissonis Less. subsp. chamissonis) wurden die beiden dominierenden Sesquiterpenlactone isoliert und ihre Struktur und Stereostruktur durch UV -, IR -, MS -, ^{1}H-NMR - und ^{13}C-NMR - Spektroskopie aufgeklärt. Es handelt sich um zwei neue Pseudoguaianolide, die von uns als Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid bezeichnet wurden. Die angegebene Konfiguration wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse von Chamissonolid bestätigt.

2. In Spuren führen die Blüten die Pseudoguaianolide Helenalin und Helenalintiglinsäureester, die nach Isolierung identifiziert wurden. Bei Helenalin und seinen Estern bzw. den entsprechenden 11,13-Dihydroverbindungen handelt es sich um den dominierenden Sesquiterpenlactontyp der Blüten von A. montana.

3. Darüber hinaus wurde ein weiteres Sesquiterpenlacton isoliert, bei dem es sich aufgrund der MS - und ^{1}H-NMR - spektroskopischen Daten um einen Strukturtyp handelt, der bisher nicht in der Gattung Arnica gefunden wurde. Die Verbindung verdient aus biosynthetischen und chemotaxonomischen Gründen besonderes Interesse.

4. Blätter von A. chamissonis subsp. genuina führen dieselben Sesquiterpenlactone (DC - Analyse). Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid wurden auch aus diesem Organ isoliert.

5. Vor dem Hintergrund der bekannten Wirkungen der A. montana - Blüten, an denen Helenalin und seine Derivate maßgeblich beteiligt sind, wurden die Wirkungen des Hauptsesquiterpenlactons Chamissonolid der analysierten A. chamissonis - Blüten untersucht.

a) Chamissonolid besitzt wie Helenalin allergene Eigenschaften (Testung an sensibilisierten Meerschweinchen), die auf dem gemeinsamen Strukturelement des α,β - ungesättigten γ - Lactonringes beruhen.

b) Anders als Helenalin zeigt Chamissonolid im Plattendiffusionstest bis zu einer Konzentration von 100 µg / Filterrondelle keine antibiotischen Eigenschaften gegenüber den getesteten Bakterien.

c) Am spontan schlagenden, rechten und elektrisch gereizten, linken Vorhof des Meerschweinchens zeigt Chamissonolid anders als Helenalin keine Wirkung (10^{-6} - 10^{-4} molare Lösungen). Am isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens wurde in diesem Konzentrationsbereich abweichend von Helenalin eine biphasische Wirkung beobachtet (zunächst negativ dann positiv inotrop).

d) An narkotisierten Katzen wurde eine atemanaleptische Wirkung nachgewiesen (1 mg/kg, i.v.).

e) Am Dextran induzierten Rattenpfotenödem wurde eine antiphlogistische Wirkung nachgewiesen, die geringer als die von Helenalin ist und derjenigen von 11,13-Dihydrohelenalin bzw. Phenylbutazon entspricht.

6. Wegen der abweichenden Sesquiterpenlactonführung und der nicht identischen Wirkung von Chamissonolid im Vergleich zu Helenalin und seinen Estern sind die Blüten von A. chamissonis Less. subsp. genuina Maguire nicht als gleichwertige Austauschdroge für die von A. montana stammenden "Arnicae flos" anzusehen.

VI. Experimenteller Teil

1. Spektroskopische Methoden*

Die Aufnahme der UV - Spektren und die Messung der molaren Extinktion erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Fa. BECKMAN bei 20 °C in Ethanol p.a..

Die Infrarotspektren wurden mit dem Spektralphotometer 297 der Fa. PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Untersuchung der Substanzen erfolgte in KBr - Preßlingen.

Die ^{1}H-NMR - Spektren wurden mit dem 80 MHz - Gerät VARIAN - Spektrometer CFT-20 (Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf) sowie mit dem 360 MHz - Gerät WH-360 der Fa. BRUKER (Zentralbereich Forschung und Entwicklung der Bayer AG., Leverkusen) in deutero - chloroformischen Lösungen mit TMS als innerem Standard gemessen. Die gepulsten Homoentkopplungen sowie die NOE - Messungen wurden am gleichen Spektrometer, das mit dem Rechner Aspect 2000 und einer interaktiven Disk in Verbindung stand, durchgeführt.

---

*Herrn Dr. H. J. Hemmerling, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Aufnahme der 80 MHz - ^{1}H-NMR - Spektren und Herrn Dr. G. Wendisch, Zentralbereich Forschung und Entwicklung der Bayer AG., Leverkusen, für die der 360 MHz - NMR - Spektren sowie für seine Hilfe bei der Interpretation. Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Aufnahme der MS - Spektren.

Die ^{13}C-NMR - Spektren wurden bei 90,52 MHz unter Protonen - Rauschentkopplung und unter Bedingungen des "gated decoupling" ebenfalls am Spektrometer WH-360 sowohl in deutero - chloroformischen als auch in deutero - acetonischen Lösungen mit TMS als Referenz vermessen.
Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT CH 7 A unter GC/MS - Kopplung mit dem Gaschromatographen VARIAN 2700 im Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf. Die Ionisationsspannung betrug jeweils 70 eV.

2. Bestimmung der physikalischen Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch Typ 350 der Fa. LEITZ bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.
Die Bestimmung der spezifischen Drehung erfolgte mit dem Polarimeter Typ 243 der Fa. PERKIN-ELMER bei 20 °C.

3. Chromatographische Methoden

3.1. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren

Als Adsorbens dienten, soweit nichts anderes angegeben, DC - Alufolien mit Kieselgel 60 F_{254} (MERCK). Die Chromatographie wurde in der Regel über eine Laufstrecke von 10 cm bei Kammersättigung durchgeführt. Die Verhältnisangaben bei den Fließmitteln beziehen sich jeweils auf Volumenanteile.

DC der Sesquiterpenlactone

System 1 : n-Pentan/Ether (32 : 68), (WILLUHN u. HERRMANN, 1978)

System 2 : n-Pentan/Ether (5 : 95)

System 3 : Benzol/Ether (50 : 50)

System 4 : n-Hexan/Isopropanol (80 : 20)

System 5 : Benzol/Ether (80 : 20)

System 6 : Chloroform/n-Hexan (95 : 5)

System 7 : Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol
(5 : 4 : 1 : 2)

System 1 diente als Standardsystem zur Auftrennung der S1 - Fraktion. Die DC - Systeme 5 bis 7 wurden zur DC der Helenalinester benutzt.

Zur Detektion wurden folgende Sprühreagenzien herangezogen:

a) Hydroxylamin/$FeCl_3$ (FEIGL und Mitarb., 1934; STAHL, 1962)

A: 10 g Hydroxylaminhydrochlorid + 90 ml H_2O

B: 20 g NaOH + 80 ml H_2O

C: 2 g $FeCl_3$ + 20 ml HCl (37 %) + 78 ml H_2O

Lösung A und B werden im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Nach Besprühen der Platte mit diesem Gemisch wird diese ca. 10 Min. lang auf 100 - 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird mit Lösung C detektiert. Die S1 reagieren unter Braunfärbung.

b) Anisaldehyd/H_2SO_4 (STAHL, 1962)

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Essigsäure (99 - 100 %) + 2 ml H_2SO_4 (95 - 97 %).

Nach dem Besprühen wird die Platte bis zur Farbdifferenzierung auf 110 °C erwärmt (ca. 5 - 10 Min.). Die Chamis-

sonolide lassen sich farblich unterscheiden. Helenalin und seine Ester reagieren unter Gelbfärbung.

c) ZIMMERMANN - Reagenz (NEHER, 1964)

A: 10 g 1,3-Dinitrobenzol + 90 ml Benzol

B: 6 g NaOH + 25 ml H_2O + 45 ml Methanol

Zunächst wird mit Lösung A besprüht, anschließend mit Lösung B. Während des Besprühens erscheinen Helenalin und seine Derivate violett gefärbt. Die Farbe verblaßt beim Liegenlassen der Platte. Die Chamissonolide zeigen keine Reaktion.

3.2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Trennung geringer Substanzmengen bzw. deren Reinigung wurden Aluminium - Folien mit Kieselgel 60 F_{254} (MERCK) verwendet. Pro Folie wurden ca. 8 mg Substanz mit Hilfe des DESAGA - Mikrodosers nach DIBBERN aufgetragen. Nach Entwicklung der Folien wurde in der Mitte ein Streifen herausgeschnitten, detektiert und in Anlehnung an diesen Streifen die entsprechenden Zonen aus den Folien herausgeschnitten. Die Elution der Substanzen vom Adsorbens erfolgte durch langsames Übertropfen eines Chloroform/Methanol - Gemisches (1 : 1) über die herausgeschnittenen Streifen. Zur Abtrennung evtl. Adsorbenspartikel wurde das eingeengte Eluat durch eine Filterspritze gegeben (vgl. DIBBERN und Mitarb., 1971).

3.3. Säulenchromatographie

Als Adsorbentien wurden Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (MERCK) und Alumina N Super I (WOELM) verwendet. Die Füllung der Säulen erfolgte durch Einschlämmen des Adsorbens in das Elutionsmittel. Das zu trennende Substanzgemisch wurde entweder in wenig Elutionsmittel gelöst aufgegeben oder auf etwas Adsorbens aufgezogen (1 : 1) und trocken auf die Säule gegeben. Die fast trockene Oberfläche wurde mit Seesand p.a. abgedeckt.

3.4. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 in Kombination mit dem Schreiber Typ 56 und dem Integrator M-1 der Fa. PERKIN-ELMER, der Gaschromatograph Typ 5710 A mit dem Schreiber 7123 A der Fa. HEWLETT-PACKARD sowie der Gaschromatograph VARIAN Typ 2700. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm/Min.. Als Trägergas diente, soweit nichts anderes angegeben, gereinigter Stickstoff. Alle Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet.

GC der Sesquiterpenlactone

System 1 : Glaskapillarsäule DUHT (Fa. MACHEREY-NAGEL),
Länge 25 m.
Stationäre Phase: Silikonöl OV-101
Injektor- und Detektortemperatur: 260 bzw. 280 °C
Säulentemperatur: Temperaturprogramm 180 - 250 °C
Anstiegrate: 10 °C pro Min.
Trägergas: Stickstoff 1 bar
RT Helenalintiglinat 6,8 Min.

System 2 : Glaskapillarsäule (Fa. MACHEREY-NAGEL), Länge 15 m
Stationäre Phase: Silikonöl OV-1
Injektor- und Detektortemperatur: 250 bzw. 270 °C
Säulentemperatur: 230 °C isotherm
Trägergas: Helium 1 bar
RT Helenalintiglinat 4,2 Min.

4. Herkunft, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials

Zur Isolierung der Sl wurden zwei in ihrer Sl - Führung identische Herkünfte von A. chamissonis subsp. genuina Maguire herangezogen.

Herkunft A: natürlicher Wuchsort Nähe Flugplatz Kodiak, Alaska/USA (Nr. 347)

Herkunft B: Murmansk (Nr. 144)

Beide Herkünfte var. interior (kleinblütige Pflanzen)

Herkunft C: natürlicher Wuchsort Kodiak, Alaska/USA (Nr. 348) var. typica (großblütige Pflanze)

Die Pflanzen wurden auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Gießen, Versuchsstation Rauischholzhausen*, sowie auf dem Versuchsfeld des Botanischen Gartens der Universität Düsseldorf

---

*Frau Prof. Dr. A. Vömel danke ich für den Anbau der Pflanzen, der mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft erfolgte.

kultiviert*. Die Blütenkörbchen wurden in den Jahren 1977 und 1978 geerntet. Die Trocknung erfolgte bei 40 - 50 °C im Umlufttrockenschrank. Bis zur Extraktion lagerte die Droge in pergamentierten Papiertüten bei - 20 °C.

5 Herstellung der Sesquiterpenlactonextrakte zur DC - Analyse

10 g getrocknete und gemahlene Blütenkörbchen von A. chamissonis subsp. genuina sowie von A. montana wurden auf einem Magnetrührer mit 50 ml Benzol kalt extrahiert, filtriert und mit 10 ml Benzol nachgespült. Der bei 60 °C eingedampfte Benzolrückstand wurde 3 mal mit je 30 ml 60 %igem Ethanol kräftig ausgeschüttelt und anschließend filtriert. Nach Abzug des Ethanols am Rotavapor wurde das fast farblose Filtrat 5 mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten, über Calciumchlorid filtrierten und mit 10 ml Chloroform nachgewaschenen Chloroformauszüge wurden eingedampft. Der leicht gelb gefärbte Rückstand wurde zur Entfernung störender Begleitstoffe in 0,5 ml Benzol aufgenommen und über eine Säule mit 20 g Alumina WOELM N Super I mit Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol (5 : 4 : 1 : 2) fil-

---

*Herrn Prof. Dr. W. Stubbe, Direktor des Botanischen Gartens der Universität Düsseldorf, danke ich für die Verfügungstellung des Versuchsgeländes und Herrn Reviergärtner W. Rogmann für den Anbau und die Pflege der aus Rhizomschnittlingen gezogenen Pflanzen.

triert. Die ersten 10 ml des Eluats wurden verworfen, die nächsten 20 ml am Rotavapor zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Benzol aufgenommen (vgl. auch HERRMANN, 1978).

Jeweils 50 µl der fast farblosen SI - Extrakte wurden in einer Länge von 1 cm bandenförmig auf Kieselgel 60 F_{254} - Folien (MERCK) aufgetragen und im Fließmittelsystem 1 chromatographiert.

6. Isolierung der Sesquiterpenlactone

6.1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton - Gesamtfraktion

In Anlehnung an POPLAWSKI und Mitarb. (1971) und HERRMANN (1978) wurden 1,78 kg getrocknete und gemahlene Blütenkörbchen von A. chamissonis subsp. genuina (1,16 kg der Varietät interior und 0,62 kg der Varietät typica, s. DC in Abb. 3, S. 10) im Soxhletverfahren mit Benzol erschöpfend extrahiert. Nach Abzug des Lösungsmittels im Vakuum wurde der zähflüssige, braune Rückstand mit Benzol zu einer 10 %igen Lösung verdünnt und diese 10 mal mit dem gleichen Volumen 60 %igen Ethanols ausgeschüttelt. Nach dem Abziehen des Ethanols wurde die verbleibende, milchigtrübe, grüngelbe wässrige Phase 10 mal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Als Rückstand der über Calciumchlorid getrockneten Chloroformausschüttelung resultierten 19,4 g einer zähflüssigen, dunkelbraunen Fraktion. Sie

wurde in Anlehnung an HERRMANN (1978) in wenig Benzol aufgenommen und mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5 : 4 : 1 : 2) über eine Säule mit 1,2 kg Alumina WOELM N Super I filtriert. Nach Abzug des Lösungsmittels lagen 8,77 g (= 0,49 % vom Blütentrockengewicht) einer grüngelben, anfangs hochviskosen, später teilweise durchkristallisierten Sesquiterpenlacton - Gesamtfraktion vor, die dc (s. Abbildung 4, S. 13) untersucht und danach sc aufgetrennt wurde.

6.2. Säulenchromatographische Fraktionierung der S1 - Gesamtfraktion

Die S1 - Gesamtfraktion (8,77 g) wurde in wenig Ether aufgenommen, an 10 g Kieselgel 60 zur SC (MERCK) adsorbiert und anschließend an 1 kg Kieselgel 60 mit n-Pentan/Ether (32 : 68) säulenchromatographisch aufgetrennt. Es wurden Fraktionen von 15 ml aufgefangen, die im System n-Pentan/Ether (5 : 95) dc auf ihre Zusammensetzung untersucht und zu 5 Teilfraktionen vereinigt wurden (s. Abb. 4, S. 13). Tabelle 13 gibt das Trennergebnis wieder.

Tabelle 13: Säulenchromatographische Auftrennung der S1 - Gesamtfraktion an Kieselgel 60 mit n-Pentan/Ether (32 : 68)

aufgefangene Fraktionen	vereinigt zu Teil-fraktion	Rückstand (g)	S1-Zusammensetzung (DC)
30 - 102	I	0,97	-
103 - 164	II	0,13	Helenalintiglinat
165 - 232	III	0,86	Helenalintiglinat 6-Desoxychamisso-nolid
233 - 325	IV	2,64	6-Desoxychamisso-nolid Helenalin nicht identifizier-tes S1 Chamissonolid
326 - 544	V	1,81	Chamissonolid

6.3. Isolierung von Chamissonolid

Die Teilfraktion IV (2,64 g; 4 hydroxamatpositive Substanzen) wurde mit Ethylacetat/Ether (50 : 50) an 425 g Alumina WOELM N Super I sc aufgetrennt. Die DC - Kontrolle der 10 ml Fraktionen ergab, daß hierbei die beiden Komponenten mit den höheren R_f - Werten gemeinsam abgetrennt wurden (0,42 g) während sich die beiden anderen hydroxamatpositiven Substanzen mit 5 l Elutionsmittel nicht von der Säule eluieren ließen. Nach anschließender Elution mit einem Petrolether/ Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5 : 4 : 1 : 2) fielen diese ebenfalls in einer gemeinsamen Fraktion an. Aus dem vereinigten und bis auf 20 ml eingeengten Eluat fielen nach 24 stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank nadelförmige, fast weiße Kristalle aus, die abgenutscht und aus Ethanol p.a. mehrfach umkristallisiert wurden.

Ausbeute: 910 mg (= 0,05 % vom Blütentrockengew.) nadelförmige, dc in mehreren Systemen einheitliche Kristalle von Chamissonolid.

Chamissonolid:

Schmp.: 202 - 203,5 °C; $[\alpha]_D^{20}$ + 54,81° ($CHCl_3$, c = 1,113);

UV: λ_{max} 205,8 nm, Ethanol (ϵ = 11.167);

IR: 3460 und 3380 cm^{-1} (OH-Gruppe an C-2 und C-4), 1760 cm^{-1} (Ketofunktion des γ - Lactonringes), 1725 cm^{-1} (Acetylgruppe an C-2), 3090, 1658, 1270 und 812 cm^{-1} (Exomethylengruppe);

MS: M^+ = 324 (3), m/z 306 (2), 264 (4), 246 (20), 228 (9), 218 (17), 192 (23), 138 (24), 137 (13), 135 (15), 133 (17), 125 (12), 123 (15), 121 (12), 119 (9), 107 (100), 97 (18),

95 (17), 93 (38), 91 (17), 81 (19), 69 (14), 55 (16), 43 (76);
^{13}C - und ^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 5, S. 33 und Tab. 3, S. 21.

6.4. Isolierung von 6-Desoxychamissonolid

0,42 g der mit den beiden hydroxamatpositiven Substanzen (hR_f 53 und hR_f 49, s. Abb. 4, S. 13 und Tab. 1, S. 14) angereicherten Teilfraktion (s. S. 90) wurden erneut an 90 g Alumina WOELM N Super I mit Ethylacetat/Ether - Gemischen aufgetrennt. Dabei wurde ausgehend von 100 % Ether der Ethylacetatanteil nach jeweils 100 ml Elutionsmittel um 5 % gesteigert. Hierbei fiel die Komponente mit dem hR_f - Wert 53 kristallin an. Durch wiederholte Umkristallisation aus Ethanol p.a. wurden farblose, nadelförmige Kristalle erhalten.

Ausbeute: 77,6 mg (= 0,004 % vom Blütentrockengew.)

6-Desoxychamissonolid:

Schmp.: 204 - 206,5 °C; $[\alpha]_D^{20}$ + 57,14° ($CHCl_3$, c = 1,160);
UV: λ_{max} 212,8 nm, Ethanol (ϵ = 10.712);
IR: 3435 cm^{-1} (OH-Gruppe an C-4), 1735 cm^{-1} (Ketofunktion des γ - Lactonringes), 1720 cm^{-1} (Acetylgruppe an C-2), 3090, 1658, 1270 und 812 cm^{-1} (Exomethylengruppe);
MS: M^+ = 308 (< 1), m/z 267 (11), 266 (8), 250 (11), 248 (39), 230 (100), 215 (21), 205 (23), 191 (24), 175 (26), 159 (49), 145 (35), 124 (61), 121 (55), 119 (33), 107 (67), 93 (33), 81 (31), 67 (19), 55 (14), 43 (11);
^{13}C - und ^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 5, S. 33 und Tab. 3, S. 21.

6.5. Isolierung von Helenalin

Bei der Isolierung von 6-Desoxychamissonolid (s. S. 91) fiel bei der sc Auftrennung eine Teilfraktion (86 mg) an, in der die hydroxamatpositive Substanz mit dem hR_f - Wert 49 angereichert vorlag. Nach erneuter, zweimaliger SC dieser Fraktion an Kieselgel 60 (MERCK) mit n-Pentan/Ether (32 : 68) und nach mehrfacher Umkristallisation aus Ether p.a. fielen weiße, dc einheitliche Kristalle an, bei denen es sich um Helenalin handelte.

Ausbeute: 8 mg (= 0,0005 % vom Blütentrockengew.)

Helenalin:

Schmp.: 162 - 168 °C; UV: λ_{max} 219, Ethanol (ϵ = 12.286); IR: 3370 cm^{-1} (OH-Gruppe an C-6), 1755 cm^{-1} (Ketofunktion des γ - Lactonringes), 1722 cm^{-1} (Ketofunktion an C-4), 1575 cm^{-1} ($\Delta^{2,3}$ - Doppelbindung), 3105, 1658 und 1270 cm^{-1} (Exomethylengruppe);

MS: M^+ = 262 (100), m/z 244 (17), 216 (20), 124 (79), 123 (43), 122 (37), 96 (63), 95 (49), 91 (57), 67 (40);

GC: System 1 (Temperaturprogramm 150 - 250 °C, Anstiegrate 10 °C pro Min.)

RT Helenalin 8 Min. 40 Sek.

^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 8, S. 42.

6.6. Isolierung von Helenalintiglinat

Die stark viskose, honigfarbene Teilfraktion II (130 mg) wurde mit Benzol/Ether (80 : 20) an 55 g Kieselgel 60 (MERCK) sc aufgetrennt. Die mit der hydroxamatpositiven Substanz (hR_f 84) angereicherten 10 ml Teilfraktionen wurden vereinigt

und der Rückstand mit dem gleichen Elutionsmittelgemisch an Kieselgel 60 aufgetrennt, wobei der Etheranteil nach jeweils 50 ml Elutionsmittel um 10 % bis auf 100 % gesteigert wurde. Dabei konnten 2 mg dieser Verbindung als weißer Niederschlag annähernd dc rein gewonnen werden. Nach DC -, GC - und GC/MS - Vergleich mit der authentischen Substanz handelte es sich um Helenalintiglinat.

Helenalintiglinat:

DC:
hR_f 72; 48; 63; 82 in System 1, 5, 6 bzw. 7

GC: System 1: RT Helenalintiglinat 6,8 Min.
RT Helenalinmethacrylat 5,35 Min.
RT Helenalinisobutyrat 4,95 Min.
System 2: RT Helenalintiglinat 4,2 Min.
RT Helenalinmethacrylat 3,4 Min.
RT Helenalinisobutyrat 3,15 Min.

MS: M^+ = 344 (2), m/z 262 (1), 244 (46), 229 (17), 216 (18), 174 (23), 173 (28), 145 (20), 124 (1), 123 (2), 122 (8), 112 (28), 110 (23), 100 (44), 96 (1), 95 (3), 83 (100), 55 (77), 46 (20), 44 (19).

6.7. Isolierung eines weiteren Sesquiterpenlactons

Nach der Abtrennung von Chamissonolid (s.S. 90) war in der Mutterlauge eine weitere hydroxamatpositive Substanz (hR_f 42) nachweisbar. Der Rückstand wurde erneut zweimal mit n-Pentan/Ether (5 : 95) sc aufgetrennt. Nach wiederholter Um-

kristallisation aus Ether lagen fast farblose Kristalle vor, die in mehreren DC - Systemen einheitlich waren.
Ausbeute: 11 mg (= 0,0006 % vom Blütentrockengew.)

Schmp.: 126,5 - 130,5 °C; UV: λ_{max} 211,5 nm, Ethanol (ϵ = 11.358); IR: 3435 cm^{-1} (OH-Gruppe), 1753 cm^{-1} (Ketofunktion des γ - Lactonringes), 1645 cm^{-1} (Bande einer Doppelbindung), 3090, 1660, 1265 und 820 cm^{-1} (Exomethylengruppe);
MS: M^+ = 248 (6), m/z 233 (9), 230 (100), 216 (47), 185 (40), 169 (24), 145 (31), 143 (38), 134 (18), 133 (29), 131 (18), 120 (18), 118 (19), 117 (32), 106 (24), 105 (34), 93 (40), 91 (42), 79 (30), 77 (31), 53 (28);
^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 10, S. 50.

7. Isolierung von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid aus Blättern von A. chamissonis subsp. genuina

0,92 kg getrocknete Blätter der Varietät interior wurden analog zu den Blüten aufgearbeitet und 130 mg Chamissonolid sowie 19 mg 6-Desoxychamissonolid isoliert.
Die Identifizierung erfolgte über Schmelzpunkt, spezifische Drehung, DC, GC/MS, UV - und IR - Spektren.

VII. Literaturverzeichnis*

ADAMS, R. u. W. HERZ: Helenalin. I. Isolation and properties; J. Am. Chem. Soc. 71, 2546-2551 (1949)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Neue Thymolderivate aus Arnica amplexicaulis; Tetrahedron Let. 28, 2827-2828 (1972)

BOHLMANN, F., J. ZIESCHE, H. ROBINSON u. R.M. KING: A pseudoguaianolide and a hydroxygeranylnerol from Kingianthus paradoxus; Phytochemistry 20, 1146-1148 (1981)

BORKOWSKI, B., Z. KOWALESKI u. L. SKRZYPCZA KOWA: Badania skladu chemicznego kwiatostanow niektorych gatunkow rodzaju Arnica; Czesc. I. Analiza frakcji flawonoidowych. Diss. Pharm. Pharmacol. 18, 367-374 (1966)

BÜCHI, G. u. D. ROSENTHAL: Terpenes. VI. The structures of Helenalin und Isohelenalin; J. Am. Chem. Soc. 78, 3860-3861 (1956)

CAVALLITO, C.J. u. T.H. HASKELL: α-Methylene butyrolactone from Erythronium americanum; J. Am. Chem. Soc. 68, 2333-2334 (1946)

DEUEL, P.G. u. T.A. GEISSMAN: Xanthinin. II. The structures of Xanthinin and Xanthatin; J. A., Chem. Soc. 79, 3778-3783 (1957)

---

* Die Abkürzungen der Fachzeitschriften erfolgten nach den Angaben des Chemical Abstracts Service Source Index

DIBBERN, H.W., D. OTT u. E. WIRBITZKI: Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln; Dtsch. Apoth. Ztg. 111, 1649-1651 (1971)

DUPUIS, G., J.C. MITCHELL u. G.H.N. TOWERS: Reaction of Alantolacton, an allergenic sesquiterpene lactone, with some amino acids. Resultant loss of immunologic reactivity; Can. J. Biochem. 52, 575-581 (1974)

EVANS, F.J. u. R.J. SCHMIDT: Plants and plant products that induce contact dermatitis; Planta Med. 38, 289-316 (1980)

EVSTRATOVA, R.I., V.I. SHEICHENKO, K.S. RYBALKO u. A.I. BANKOVSKII: The structure of Arnifolin, a sesquiterpene lactone from Arnica foliosa Nutt. and Arnica montana L.; Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal 3 (9), 39-45 (1969)

FABER, K.: Die Arnika (Arnica montana); Pharmazie 8, 179-187 u. 286-298 u. 340-346 (1953)

FEIGL, F., V. ANGER u. O. FREHDEN: Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen (II); Mikrochemie 15, 9-12 (1934)

GEßNER, O.: Pharmakologie der Arnica montana L.; Med. Monatsschr. 3, 825-828 (1949)

GEßNER, O. u. ORZECHOWSKI: Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa; Universitätsverlag Carl Winter, Heidelberg (1974)

GÜNTHER, H.: NMR-Spektroskopie; Thieme Verlag, Stuttgart (1973)

GÜNTZEL, U., F. SEIDEL u. H. KATING: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten -I- Der Gehalt an ätherischem Öl in den Blüten verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 15, 205-214 (1967)

HALL, I.H., K.H. LEE, E.C. MAR u. C.O. STARNES: Antitumor agents 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by Tenulin and Helenalin and related cyclopentenones; J. Med. Chem. 20, 333-337 (1977)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, Y. SUMIDA, R.Y. WU, T.G. WADDELL, J.W. COCHRAN u. K.G. GERHART: Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds J. Pharm. Sci. 68, 537-542 (1979)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES u. T.G. WADDELL: Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents; J. Pharm. Sci. 69 (5), 537-543 (1980)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, O. MURAOKA, Y. SUMIDA u. T.G. WADDELL: Antihyperlipidemic activity of sesquiterpene lactones and related compounds; J. Pharm. Sci. 69 (6), 694-697 (1980)

HAUSEN, B.M.: Arnikaallergie; Der Hautarzt 31, 10-17 (1980)

HAUSEN, B.M., H.-D. HERRMANN u. G. WILLUHN: The sensitizing capacity of Compositae plants - I. Occupational contact dermatitis from Arnica longifolia EAT.; Contact Dermatitis 4, 3-10 (1978)

HAYNES, L.J.: Physiologically active unsaturated lactones; Quart. Rev. 2, 46-61 (1948)

HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 3; Birkhäuser-Verlag, Basel/Stuttgart (1964)

HEROUT, V.: Taxonomisches Merkmal der Compositae; Planta Med. 14, 97-106 (1966a)

HEROUT, V.: Beitrag zur Chemotaxonomie der Familie der Compositae; Herba Hung. 5, 95-99 (1966b)

HEROUT, V.: Chemotaxonomy of the family Compositae (Asteraceae); in: Pharmacognosy and phytochemistry; Springer Verlag, Heidelberg/New York (1971)

HEROUT, V. u. F. SORM: Chemotaxonomy of the sesquiterpenoids of the Compositae; in: Perspectives in phytochemistry; Academic Press, London/New York (1969)

HERRMANN, H.-D.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica longifolia Eaton und ihre Wirkungen; Dissertation, Düsseldorf (1978)

HERRMANN, H.-D., G. WILLUHN u. B.M. HAUSEN: Helenalinmethacrylate: a new pseudoguaianolide from the flowers of Arnica montana L. and the sensitizing capacity of their sesquiterpene lactones; Planta Med. 34, 299-304 (1978)

HERZ, W.: Pseudoguaianolides in Compositae; in: Recent advances in phytochemistry 1, 229-269, New York (1968)

HERZ, W.: Sesquiterpene lactones in Compositae; in: Pharmacognosy and phytochemistry; Springer Verlag, New York (1971)

HERZ, W.: Pseudoguaianolides in Compositae; in: Chemistry in botanical classification; Nobel Symposia 25, 153-172 (1973)

HERZ, W., P.S. SUBRAMANIAM u. N. DENNIS: Stereochemistry of Flexuosin A and related compounds; J. Org. Chem. 34, 2915-2917 (1969)

HLADON, B., B. DROZDZ, M. HOLUB u. T. BORKIEWICZ: Sesquiterpene lactones XVI. In vitro studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue cultures of human and animal malignant cells; Arch. Immunol. Ther. Exp. 23, 845-855 (1975)

HOLUB, M., Z. SAMEK u. J. TOMAN: Carabrone from Arnica foliosa; Phytochemistry 11, 2627-2628 (1972)

HULTÉN, E.: Flora of Alaska and neighboring territories; Stanford University Press, Stanford (California); 920-921 (1968)

IVIE, G.W., D.A. WITZEL, W. HERZ, R. KANNAN, J.O. NORMAN, D.D. RUSHING, J.H. JOHNSON, L.D. ROWE u. J.A. VEECH: Hymenovin. Major toxic constituent of western bitterweed (Hymenoxys odorata DC.); J. Agric. Food Chem. 23, 841-845 (1975)

KATING, H., W. RINN u. F. SEIDEL: Das ätherische Öl von Arnica chamissonis Less.; Abhdl. Marburger Gelehrten Ges., Wilh. Fink Verlag, München; Heft 4 (1973)

KIM, H.L.: Toxicity of sesquiterpene lactones; Res. Com. Chem. Path. Pharmacol. 28, 189-192 (1980)

KONDO, Y., F. HAMADA u. F. YOSHIZAKI: 2-Methoxydihydrohelenalin from the rhizoma of sendai Helenium autumnale L.; Heterocycles, 5, 373-376 (1976)

KONDO, Y., T. TOMIMORI, N. HIRAGA u. T. TAKEMOTO: Picrohelenin, a new cytotoxic and bitter pseudoguaianolide from Sendai Helenium autumnale L.; Heterocycles 6, 301-306 (1977)

KOWALEWSKI, Z., C. SKRZYPCZAKOWA u. I. MATLAWSKA: Investigations on chemical composition of inflorenscence of some Arnica species; Diss. Pharm. Pharmacol. 21, 249-252 (1969)

KREBS, H.A. u. K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-36 (1932)

LAMSON, P.D.: On the pharmacological action of Helenin, the active principle of Helenium autumnale; J. Pharmacol. Exp. Ther. 4, 471-489 (1913)

LEE, K.-H., D.C. ANUFORO, E.-S. HUANG u. C. PIANTADOSI: Antitumor agents I: Angustibalin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone from Balduina angustifolia; J. Pharm. Sci. 61, 626-628 (1972)

LEE, K.-H., T. IBUKA, R.-Y. WU u. T.A. GEISSMAN: Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds; Phytochemistry 16, 1177-1181 (1977a)

LEE, K.-H., M. HARUNA, H.C. HUANG, B.S. WU u. I.H. HALL: Antitumor agents XXIII: Helenalin, an antitumor principle from Anaphalis morrisonicola HAY.; J. Pharm. Sci. 66, 1194-1195 (1977b)

LIST, P.H. u. B. FRIEBEL: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana L.; Arzneim.- Forschung 24, 148-151 (1974)

LUCKNER, M., O. BESSLER u. R. LUCKNER: Vorschläge für den Drogenteil des DAB 7 - 14. Mitt.: Flores Arnicae; Pharmazie 20, 681-685 (1965)

MAGUIRE, B.: A monograph of the genus Arnica; Brittonia 4, 386-511 (1943)

MITCHELL, J.C.: Allergic contact dermatitis from Compositae; Trans. St. John's Hosp. Dermatol. Soc. 55, 174-183 (1969)

MITSCHER, L.A.: Antimicrobial agents from higher plants; in: Recent advances in phytochemistry 9, 243-282, Plenum Press, New York/London (1975)

NEHER, R.: Steroid chromatography, S. 126 (5c); Elsevier Publishing Company, Amsterdam/London/New York (1964)

OLECHNOWICZ-STEPIEN, W. u. S. STEPIEN: In vitro and in vivo studies on the activity of Helenine and its components against some species of dermatophytes; Diss. Pharm. 15, 17-22 (1963)

PEYER, W.: Über Tinctura Arnicae; Apotheker Ztg. 81, 1237-1238 (1927)

POPLAWSKI, J., M. HOLUB, Z. SAMEK u. V. HEROUT: On terpenes. CCIX Arnicolides - Sesquiterpenic lactones from the leaves of Arnica montana L.; Collect. Czech. Chem. Commun. 36, 2189-2199 (1971)

RINN, W.: Isobuttersäuremethylester - Hauptbestandteil des ätherischen Öles der Rhizome und Wurzeln von Arnica chamissonis; Planta Med. 18, 147-149 (1970)

RIOS, T., A. ROMO DE VIVAR u. J. ROMO: Stevin, a new pseudoguaianolide isolated from Stevia rhombifolia H.B.K.; Tetrahedron 23, 4265-4269 (1967)

RODRIGUEZ, E., H. YOSHIOKA u. T.J. MABRY: The sesquiterpene lactone chemistry of the genus Parthenium (Compositae); Phytochemistry 10, 1145-1154 (1971)

RÜTTGER, P.-M.: Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.; Dissertation, Düsseldorf (1981)

RYBALKO, K.S., E.A. TRUTNEW u. B.N. KIBALTSCHITSCH: Über eine kristalline Substanz aus Arnica foliosa; Aptetschn. Delo 14, 32-33 (1965)

SAMEK, Z.: The determination of the stereochemistry of five-membered α,β-unsaturated lactones with an exomethylene double bond based on the allylic long-range couplings of exomethylene protons; Tetrahedron letters 9, 671-676 (1970)

SCHOENEMANN, H.: Vergiftungen mit Tee aus Arnikablüten; Muench. Med. Wochenschr. 85, 787-788 (1938)

SCHULTE, K.E., G. Rücker u. K. Reithmayr: Einige Inhaltsstoffe von Arnica chamissonis und anderen Arnica-Arten; Lloydia 32, 360-368 (1969)

SCHULZ, H.: Wirkung und Anwendung der deutschen Arzneipflanzen; Leipzig (1929)

SCHULZ, K.H., B.M. HAUSEN, L. WALLHÖFER u. P. SCHMIDT-LÖFFLER: Chrysanthemen-Allergie - 2. Mitt.: Experimentelle Untersuchungen zur Identifizierung der Allergene; Arch. Dermatol. Forsch. 251, 235-244 (1975)

SETH, S.C. u. M. BHATIA: Cardiovascular effects of Parthenin; J. Molec. Cell. Card. 10 (Supp. I), 100 (1978)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1962)

STEELINK, C. u. J.C. SPITZNER: Sesquiterpene lactones in chemotaxonomy; Phytochemistry 5, 357-365 (1966)

STUHLFAUTH, K.: Die Arnika im Tierversuch; Dissertation, München, 1936; s.a. Hippokrates 9, 1131 (1938)

THIES, H.: Pharm. Ind. 10, 269 (1943); zitiert nach D. FRIEDEL: Neue Inhaltsstoffe der Blüten von Arnica montana L. und ihre Wirkung; Dissertation, Marburg (1972)

TSCHIRCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie, Bd. II, S. 1174; Verlag Chr. Hermann Tauchnitz, Leipzig 1917

TSAI, L., J. HIGHET u. W. HERZ: The mass spectra of pseudoguaianolides related to Helenalin; J. Org. Chem. 34, 945-948 (1969)

WIEBKE, M., J. KRESKEN, D. MOOTZ u. G. WILLUHN: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis LESS.: Röntgenstrukturanalyse von Chamissonolid; im Druck

WILLIAMS, D.H. u. I. Fleming: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung; Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

WILLUHN, G.: Neue Ergebnisse der Arnikaforschung; Pharmazie in unserer Zeit 10, 1-7 (1981)

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Zwei Sesquiterpenlactone aus den Blüten von Arnica longifolia; Arch. Pharm. 309, 333-335 (1976)

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Arnikablüten und Arnikatinktur (DAB 7) anhand ihrer Sesquiterpenlactone; Pharm. Ztg. 123, 1803-1808 (1978)

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten; Planta Med. 37, 325-332 (1979)

WILLUHN, G. U. J. KRESKEN: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis Less.; Planta Med. 42, 107 (1981)

WITZEL, D.A., G.W. IVIE u. J.W. DOLLAHITE: Mammalian Toxicity of Helenalin, the toxic principle of Helenium microcephalum DC (Smallhead Sneezeweed); Am. J. Vet. Res. 37, 859-861 (1976)

YANAGITA, M., S. INAYAMA u. T. KAWAMATA: The stereostructures of Pulchellidine and Pulchellin; Tetrahedron Letters 2, 131-134 (1970a)

YANAGITA, M., S. INAYAMA u. T. KAWAMATA: Neopulchellidine and Neopulchellin; Tetrahedron Letters 34, 3007-3010 (1970b)

YOSHIOKA, H., T.J. MABRY u. B.N. TIMMERMANN: Sesquiterpene lactones: Chemistry, NMR and plant distribution; University of Tokyo Press, Tokyo (1973)

B. Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis

I. Einleitung

Die in den tropischen Gebieten Südamerikas beheimatete C o s t u s s p i r a l i s (Jacq.) Roscoe wird neben anderen Costus - Arten seit alters her in der Volksmedizin der Länder dieser Region verwendet. Preßsäfte und Abkochungen aus Blättern, Stengeln und Rhizomen dienten und dienen zur Therapie von Nieren- und Blasenerkrankungen, Aufgüsse aus Stengeln und Rhizomen wurden zur Behandlung von Gonorrhoe und Syphilis herangezogen (TEIXEIRA DA FONSECA, 1922; HOEHNE, 1939; HEGNAUER, 1964; CRUZ, 1965; BALBACH, 1972). Der Pflanze werden damit antibiotische und starke diuretische Eigenschaften nachgesagt. Darüber hinaus fand C. spiralis volksmedizinische Anwendung bei Herzinsuffizienz, wobei eine verstärkte Ödemausschwemmung zu einer Herzentlastung führen soll und Anwendung als Emmenagogum (HOEHNE, 1939; CRUZ, 1965; BALBACH, 1972).

Costus spiralis gehört zu der großen tropischen Familie der Zingiberaceae. Die Affen-, Sumpf- oder Waldrohr genannte Staude treibt aus einem fleischigen, mit Schuppen besetzten Rhizom einen bis zu drei Meter hohen aufrechten Stengel. Die hellgrünen, sitzenden Blätter werden bis zu 43 cm lang und 14 cm breit und steigen spiralig zu dem 25 - 70 cm hohen, kolbenförmigen Blütenstand auf. Die einzelnen, etwa 6 cm großen, rosafarbenen Blüten werden von dunkelroten, schuppenförmigen Deckblättern geschützt (DA ROCHA, 1947; BRAGA, 1960; CRUZ, 1965; BALBACH, 1972; MAAS, 1972).

LOESENER (1930) unterscheidet bei den Zingiberaceae die Unterfamilien Zingiberoideae und Costoideae. Die Hauptkriterien für diese Untergliederung sind das Vorkommen bzw. Fehlen von Harz- und Ölzellen und die Blattstellung. Bei den Zingiberoideae sind die Blätter zweizeilig angeordnet und bilden mit ihren Blattscheiden einen Scheinstengel. Bei den Costoideae dagegen, zu denen Costus spiralis gehört, sind die Blätter spiralig an einem ausgeprägten Stengel inseriert. Die in allen vegetativen Organen der Zingiberoideae vorkommenden Harz- und Ölzellen fehlen den Costoideae ganz (vgl. LOESENER, 1930; TOMBINSON, 1956; HEGNAUER, 1964).

Während die ölzellführenden Zingiberoideae aufgrund der hier anzutreffenden vielen Gewürz- und Heilpflanzen chemisch bereits recht gut untersucht worden sind, steht die chemische Charakterisierung der Costoideae noch völlig am Anfang. Hier hat in den letzten Jahren jedoch die Gattung Costus durch den Nachweis von Steroidsaponinen an Bedeutung gewonnen. Aus den Rhizomen der in Indien beheimateten Costus speciosus wurden die Spirostanole Diosgenin und Tigogenin isoliert und neben Sitosteringlykosid das Vorkommen von drei Steroidsaponinen beschrieben (PANDEY u. DASGUPTA, 1970; SARIN und Mitarb., 1976; CHAKRAVARTI und Mitarb., 1976). Die beiden Hauptsaponine wurden von TSCHESCHE u. PANDEY (1978) inzwischen als die Diosgeninglykoside Gracillin und Dioscin identifiziert. Der Diosgeningehalt der getrockneten Rhizome liegt bei 2,4 %, so daß diesen großes Interesse als Ausgangsmaterial für die Diosgeningewinnung entgegengebracht wird, das seinerseits für

die partialsynthetische Herstellung von therapeutisch verwendeten Steroidhormonen herangezogen wird (PANDEY und Mitarb., 1972; BEDI und Mitarb., 1976; SINGH und Mitarb., 1980).

Da Steroidsaponine eine antibiotische, antimykotische, antiphlogistische und diuretische Wirkung entfalten (VOGEL, 1963; WOLTERS, 1966; WULFF, 1968; PANDEY und Mitarb., 1972), können die Wirkstoffe der chemisch bisher nicht bearbeiteten südamerikanischen Costus spiralis gegebenenfalls in dieser Stoffgruppe zu suchen sein. Aus diesem Grund sollte erstmals die Steroidführung dieser volksmedizinisch genutzten Costus - Art qualitativ und quantitativ untersucht werden.

II. Phytochemische Charakterisierung der Rhizome, Stengel und Blätter von Costus spiralis

Da über die Inhaltsstoffe von Costus spiralis bisher keine Untersuchungen vorlagen, wurden zunächst mit jeweils 10 g pulverisierten Rhizomen, Stengeln und Blättern allgemeine Nachweisreaktionen auf Alkaloide, Flavonoide, Gerbstoffe und Saponine durchgeführt (WICHTL, 1971) sowie durch eine Wasserdampfdestillation und eine DC - Analyse der Methanolextrakte gezielt auf das Vorkommen von ätherischem Öl bzw. Steroidsaponinen geprüft. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tabelle 14 wiedergegeben. Aufgrund der Farb- und Fällungsreaktionen (MAYER'S - Reagenz, DRAGENDORFF'S - Reagenz, Jodlösung) kann das Vorliegen von Alkaloiden ausgeschlossen werden. Die Farbreaktionen auf Flavonoide (WILSON-TAUBÖCK - Reaktion, Fluoreszenz - Test) ergaben keine Hinweise auf nennenswerte Mengen an Flavonoiden. Desgleichen führten die drei Organe kein ätherisches Öl. Mit Eisen(III) - Salzen und durch die Fällungsreaktionen mit Bleiacetat ließen sich geringe Mengen der für Zingiberaceen typischen Gerbstoffe nachweisen. Die Schaumprobe auf Saponine war bei allen drei Organen positiv, besonders stark bei den Rhizomen. Im DC der mit n-Butanol/Ethanol/Wasser (5 : 1 : 1) aufgetrennten Methanolextrakte ließen sich mit Anisaldehyd/H_2SO_4 gelb färbende Steroidsaponine detektieren. Dieses Ergebnis entsprach den an den Rhizomen von Costus speciosus durchgeführten Untersuchungen (DASGUPTA u. PANDEY, 1970; PANDEY und Mitarb., 1972).

Tabelle 14: Ergebnisse der Nachweisreaktionen auf verschiedene Wirkstoffgruppen in den einzelnen Organen von Costus spiralis

Inhaltsstoffe	Rhizom	Stengel	Blatt
Alkaloide	-	-	-
Flavonoide	(+)	(+)	(+)
Gerbstoffe	+	+	+
ätherisches Öl	-	-	-
Saponine	++	(+)	+
Steroidsaponine	+++	(+)	+

III. Die Steroidsaponine der Rhizome

1. Isolierung der Steroidsaponinfraktion

Die Voruntersuchung hatte ergeben, daß bei C. spiralis Steroidsaponine besonders in den unterirdischen Organen angereichert sind. Zu ihrer Isolierung wurden 964 g trockene und gemahlene Rhizome im Soxhlet - Extraktor mit Petrolether entfettet (Petroletherextrakt 9,1 g, entsprechend 0,94 % vom Trockengewicht) und anschließend mit Methanol erschöpfend extrahiert. Als Rückstand fielen 60,8 g (= 6,3 % vom Trockengew.) eines dunkelbraunen, hochviskosen Extraktes an. Die mit diesem Extrakt durchgeführten DC - Analysen ergaben die beste Auftrennung der Steroidsaponine im Fließmittel n-Butanol/Ethanol/Wasser (5 : 1 : 1). Hier ließen sich insgesamt vier Steroidglykoside nachweisen, die sich mit Anisaldehyd/H_2SO_4 gelb färbten (s. Abb. 24). Eine Differenzierung zwischen den sich mit diesem Reagenz gelb färbenden Spirostanolglykosiden und Ring F - offenen bisdesmosidischen Furostanolglykosiden ist

mit EHRLICH'S - Reagenz möglich, mit dem letztere eine Rotfärbung, erstere eine Gelbfärbung ergeben (KIYOSAWA und Mitarb., 1968). Die Detektion mit diesem Reagenz ergab eine Rotfärbung aller vier Glykoside (s. Abb. 24). Durch Gelbfärbung charakterisierte Spirostanolglykoside konnten nicht nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich bei Detektion mit LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz ein weiterer, violett gefärbter Fleck (hR_f 78), der in Laufhöhe und Färbung mit einem vergleichsweise mitchromatographierten Steringlykosidgemisch übereinstimmte.

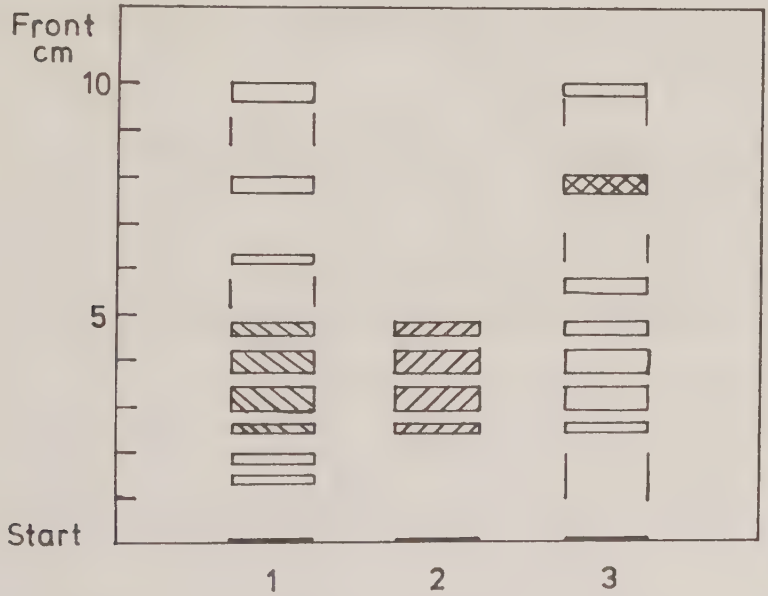


Abbildung 24: DC der Steroidsaponin - Rohfraktion

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
System: n-Butanol/Ethanol/Wasser (5 : 1 : 1)
Detektion: 1 = Anisaldehyd/H_2SO_4 gelb
2 = EHRLICH'S - Reagenz rot
3 = LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz violett

Zur Isolierung der Furostanolglykoside wurde der Methanolextrakt mit 96 %igem Ethanol über eine Säule mit schwach sauerem Ionenaustauscher eluiert, die Saponine aus dem eingeengten Eluat mit Ether ausgefällt und die sirupöse Etherfällung (9,4 g) an Kieselgel sc aufgetrennt (s. Exp. Teil S. 152). Nach weiterer Reinigung der glykosidhaltigen Fraktion durch wiederholte SC wurden 180 mg einer amorphen Glykosidfraktion erhalten, die im DC neben den vier Furostanolglykosiden lediglich noch Spuren von zwei bei der Aufarbeitung entstandenen, sich gelbfärbenden Spirostanolglykosiden zeigte. Eine weitere Auftrennung in die Einzelglykoside wurde nicht vorgenommen.

2. Isolierung und Identifizierung von Diosgenin

Zur Isolierung und Identifizierung der Aglyka wurden 100 mg der gereinigten Steroidsaponinfraktion mit 2n methanolischer Salzsäure vier Stunden lang am Rückfluß hydrolysiert. Nach Neutralisation mit stark basischem Ionenaustauscher wurde das Aglykon mit Chloroform ausgeschüttelt und der Chloroformrückstand über eine Aluminiumoxid - Säule mit Petrolether/Ether - Gemischen eluiert. Hierbei fielen 42 mg einer dc einheitlichen Substanz an, die aus Aceton in langen, weißen Nadeln kristallisierte. Die Substanz zeigte im DC gleiches Laufverhalten und gleiche Anfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4 wie mitchromatographiertes Diosgenin und Yamogenin (Laufmittel: n-Hexan/Aceton (8 : 2) nach JAIN (1976), hR_f 57, braungelb). Das gleichzeitige Vorliegen des 5α - gesättigten Steroidsapogenins Tigogenin, das sich in diesem System von den genannten Δ^5 - ungesättigten

Verbindungen nicht abtrennt, konnte durch DC an mit $AgNO_3$ - imprägnierten Kieselgelschichten im Fließmittel Chloroform/ Ether/Essigsäure (97 : 2,5 : 0,5) (DAWIDAR und Mitarb., 1973) ausgeschlossen werden (s. Abb. 25).

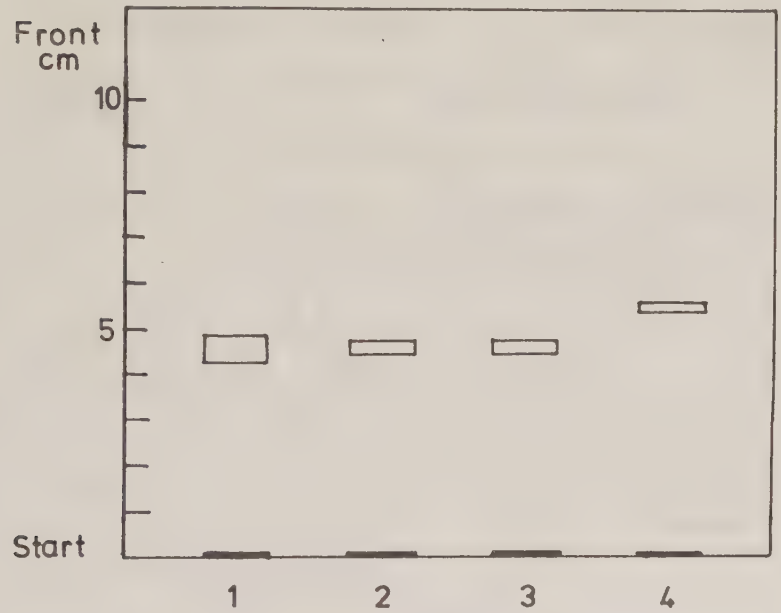
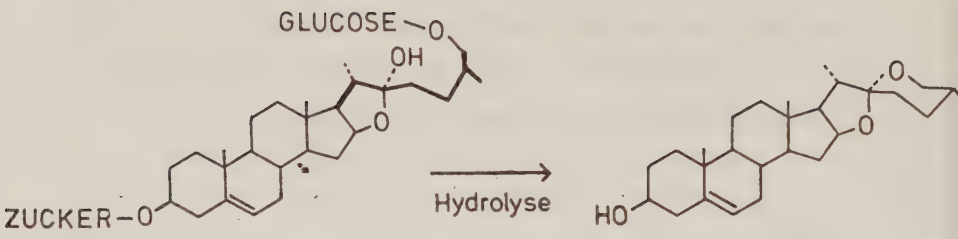


Abbildung 25: DC des isolierten Steroidsapogenins (1) im Vergleich mit Diosgenin (2), Yamogenin (3) und Tigogenin (4)

Schicht: $AgNO_3$ - imprägniertes Kieselgel
System: Chloroform/Ether/Essigsäure (97 : 2,5 : 0,5)
Detektion: Anisaldehyd/H_2SO_4

Nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, spezifischer Drehung und IR - Spektrum (s. Abb. 26) handelt es sich bei der isolierten Verbindung um Diosgenin, und auch das hergestellte Acetylderivat stimmte in diesen Konstanten mit den Angaben für Diosgeninacetat überein (s. Tab. 15).



FUROSTANOLGLYKOSID DIOSGENIN

Tabelle 15: Schmelzpunkt und spezifische Drehung von Diosgenin, Yamogenin und ihren Acetaten

Substanz	Genin		Acetat	
	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$	Schmp. °C	$[\alpha]_D^{20}$
isolierte Verbindung	205-208	- 128,6	197-199	- 121,4
Diosgenin	208-209[1,3)]	- 129[2)]	199-202[2)]	- 121[2)]
Yamogenin	187-188[1)]	- 129[2)]	182[2)]	- 119[2)]

1) JEFFERIES u. HARDMAN (1972) 2) TSCHESCHE u. WULFF (1973)
3) TSCHESCHE u. PANDEY (1978)

Besser als durch seine physikalischen Konstanten läßt sich das 25 R/25 S - Steroidsapogeninpaar Diosgenin/Yamogenin IR - spektroskopisch unterscheiden. Von den im Spektrum auftretenden charakteristischen Banden bei 866, 900, 920 und 987 cm^{-1} zeigen diejenigen bei 900 und 920 cm^{-1} jeweils unterschiedliche Intensitäten, die auch für eine quantitative Bestimmung herangezogen werden können (WALL und Mitarb., 1955; JEFFERIES u. HARDMAN, 1972). Bei reinem Yamogenin ist die

Bande bei 920 cm^{-1} 2,3 mal höher als diejenige bei 900 cm^{-1}, bei reinem Diosgenin dagegen umgekehrt die Bande bei 900 cm^{-1} um den Faktor 6,3 höher als die Bande bei 920 cm^{-1}. Das IR - Spektrum des isolierten Aglykons wies einen Quotienten von 6,5 der Banden 900/920 cm^{-1} auf, so daß es sich hier um reines Diosgenin handelt.. Die für Yamogenin typische Bande bei 952 cm^{-1} fehlte ganz (s. Abb. 26).

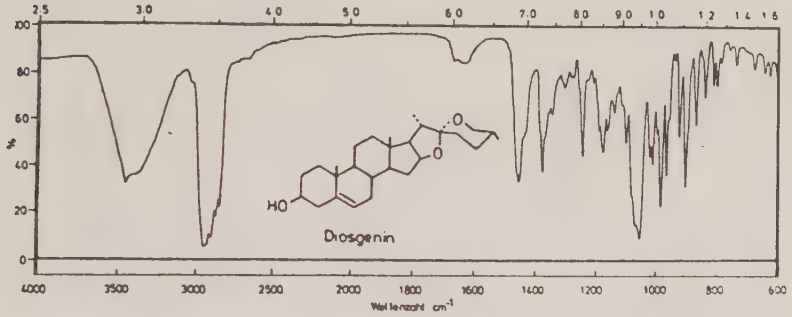


Abbildung 26: IR - Spektrum des isolierten Diosgenin

3. Identifizierung der Zucker

Die im neutralisierten und eingeengten Hydrolysat in der wässrigen Phase vorliegenden Zucker wurden durch DC - und GC - Analyse identifiziert.

Im DC auf Kieselgur G - Schichten (Fließmittel: n-Butanol/Aceton/Phosphatpufferlösung pH 5 = 4 : 5 : 1; WALDI, 1965; s. Exp. Teil S. 147) traten als einzige Zucker Glucose (hR_f 42) und Rhamnose (hR_f 95) auf (s. Abb. 27). Die Detektion erfolgte mit p-Anisidiniumchlorid - Reagenz, mit dem sich Pentosen und Hexosen farblich differenzieren lassen (rotbraun bzw. grünbraun, s. PETRE und Mitarb., 1976).

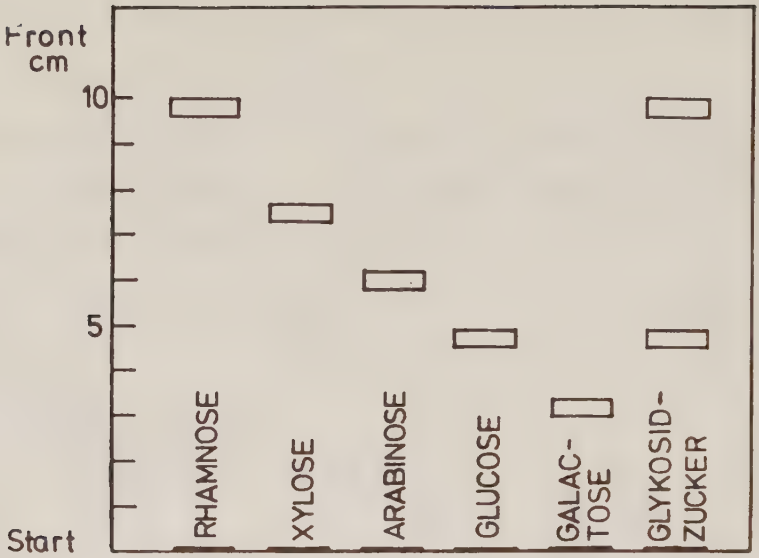


Abbildung 27: DC der Zuckerkomponenten der Furostanolglykoside

Schicht: Kieselgur G
System: n-Butanol/Aceton/Phosphatpuffer pH 5 (4 : 5 : 1)
Detektion: p-Anisidiniumchlorid in n-Butanol

Zur gc Identifizierung wurden die Zucker mit Natriumborhydrid reduziert und der Zuckeralkohol acetyliert (SLONEKER, 1972). Im GC erschienen zwei Peaks, deren Retentionszeiten mit den authentischen Alditolacetaten von Rhamnose (8,4 Min.) und Glucose (35,8 Min.) übereinstimmten (s. Abb. 28, vgl. auch JANSSON und Mitarb., 1976). An der Glykosidbildung der vier Furostanolglykoside sind somit lediglich die Zucker Rhamnose und Glucose beteiligt.

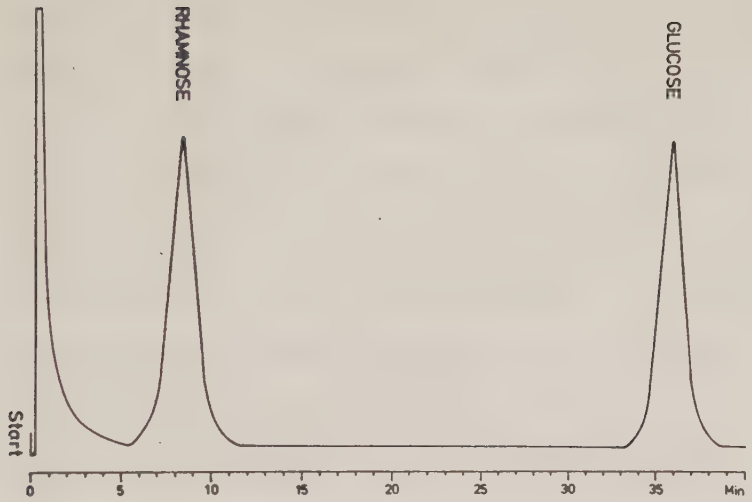


Abbildung 28: GC der in die Alditolacetate überführten Zucker der Furostanolglykoside
(Säule: OV-225, 3 %, 190 °C, isotherm)

4. Quantitative Bestimmung von Diosgenin in den unterirdischen Organen

Die quantitative Bestimmung des Diosgeningehaltes in den unterirdischen Organen erfolgte spektralphotometrisch unter Ausnutzung der Farbreaktion mit Antimon(III)-chlorid in Perchlorsäure. Dieses Reagenz wurde bereits mehrfach zur Gehaltsbestimmung der Δ^5 - ungesättigten Steroidsapogenine Diosgenin und Yamogenin in pflanzlichen Rohextrakten herangezogen (SOFOWARA u. HARDMAN, 1974; WILLUHN u. KÖTHE, 1981).

Die Steroidglykoside wurden quantitativ mit Methanol aus den getrockneten und pulverisierten Rhizomen extrahiert, der

1 g Droge entsprechende Methanolextrakt hydrolysiert und nach Neutralisation quantitativ mit Chloroform ausgeschüttelt. Der erhaltene Chloroformauszug wurde anschließend auf genau 20,00 ml eingestellt und davon jeweils 20 µl an DC - Alufolien (Kieselgel) mit n-Hexan/Aceton (8 : 2) chromatographiert. Die herausgeschnittene Diosgenin - Zone wurde mit dem Desaga - Elutor (DIBBERN und Mitarb., 1971) mit Chloroform/ Methanol (1 : 1) vollständig eluiert und der Rückstand in einem Schliffgläschen mit dem Reagenz (5 ml 25 % Antimon(III)-chlorid in 60 %iger Perchlorsäure) intensiv geschüttelt. Die Extinktionsmessung der auftretenden Färbung erfolgte nach genau 8 Min. gegen das Reagenz bei 498 nm. Die Diosgenin-gehalte wurden einer zuvor erstellten Eichkurve (s. Exp. Teil S. 155) entnommen. Durch Zugabe von isolierter Diosgenin - Reinsubstanz zum Methanolextrakt wurde die Fehlergrenze dieser Methode mit 3,5 % ermittelt.
Es wurden insgesamt drei Bestimmungen durchgeführt und für die Gehaltsangabe gemittelt. Danach enthalten die unterirdischen Organe von Costus spiralis 0,36 % Diosgenin, das in glykosidisch gebundener Form vorliegt.

IV. Die Sterine der Rhizome

1. Fraktionierung des Petroletherextraktes

In den Rhizomen von Costus speciosus wurde neben den Diosgeninglykosiden ein als Saponin A bezeichnetes Sitosteringlykosid identifiziert (TSCHESCHE u. PANDEY, 1978). Im Methanolextrakt der Rhizome von Costus spiralis konnten wir neben den Furostanolglykosiden ebenfalls ein Steringlykosid nachweisen

(s. Abb. 24, S. 111). Neben glykosidisch gebundenen Sterinen führen Pflanzen stets auch frei und verestert vorliegende Sterine, die wegen ihrer Lipidlöslichkeit im Petroletherextrakt anfallen. Anhand von Vergleichssubstanzen ließen sich diese dc im Petroletherextrakt der Rhizome von C. spiralis (9,1 g, s.S. 110) mit LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz und mit Molybdatophosphorsäure detektieren (s. Abb. 29). Unterhalb der Sterinzone trat im DC eine weitere Komponente auf, die sich mit Molybdatophosphorsäure rotviolett färbte und hierin sowie in der Laufhöhe mit Diosgenin übereinstimmte (s. Abb. 29).

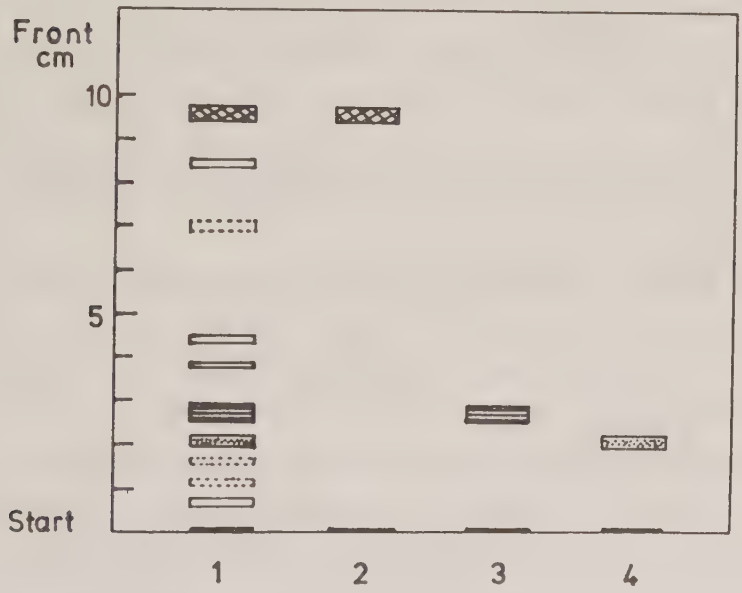


Abbildung 29: DC des Petroletherextraktes aus den Rhizomen von Costus spiralis (1)

Vergleichssubstanzen: Cholesterinoleat (2), Sitosterin/Cholesterin - Gemisch (3) und Diosgenin (4)

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
System: Petrolether/Ethylacetat/Benzol (80 : 15 : 5)
Detektion: Molybdatophosphorsäure

braunviolett blauviolett rotviolett

Zur Isolierung dieser Komponente sowie der freien Sterine und Sterinester wurden 5 g Petroletherextrakt an 520 g Aluminiumoxid sc aufgetrennt (s. Exp. Teil S. 156). Hierbei wurden 280 mg einer Sterinesterfraktion, 455 mg einer Fraktion mit frei vorliegenden Sterinen und 135 mg einer Fraktion mit der sich rotviolett färbenden Komponente erhalten.

2. Identifizierung der frei vorliegenden Sterine

Zur weiteren Reinigung der frei vorliegenden Sterine wurden 300 mg der Sterinfraktion erneut an 265 g Kieselgel sc mit einem Benzol/Ether - Gemisch aufgetrennt. Dabei fielen 156 mg freie Sterine an, die in mehreren DC - Systemen einheitlich waren und dieselbe Laufhöhe wie ein Steringemisch aus Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und Sitosterin zeigten.

Die weißen, aus Aceton plättchenförmig kristallisierenden Sterine schmolzen bei 137 - 139 °C. Die mit Acetanhydrid in Pyridin hergestellten Acetylderivate hatten einen Schmelzpunkt von 124 - 126 °C.

Das IR - Spektrum der Sterine zeigte neben den allgemeinen CH - Valenzschwingungen der gesättigten Kohlenwasserstoffe im Bereich von 2850 - 3000 cm^{-1} und den Absorptionsbanden der Methylengruppen bei 1450 cm^{-1} die nach IDLER und Mitarb. (1953) für Δ^5 - Sterine charakteristischen Banden bei 1035, 1022, 956, 879 und 838 cm^{-1}. Die Absorption für die Δ^5 - Doppelbindung bei 1676 cm^{-1} war verhältnismäßig gering, was das gleichzeitige Vorliegen von gesättigten Sterinen in dem

Steringemisch vermuten ließ. Ein Dublett im Bereich von 1375 cm^{-1} wies auf die geminalen Methylgruppen (KRAFT, 1975) und die Schwingung bei 970 cm^{-1} auf die Anwesenheit eines Sterins mit einer Δ^{22} - Doppelbindung hin (Stigmasterin, vgl. JOHNSON und Mitarb., 1957). Bemerkenswert war das Auftreten einer CH - Valenzschwingung bei 3050 cm^{-1}, die ein charakteristisches Signal für das Vorliegen eines Cyclopropanringes darstellt (WILLIAMS u. FLEMING, 1979).

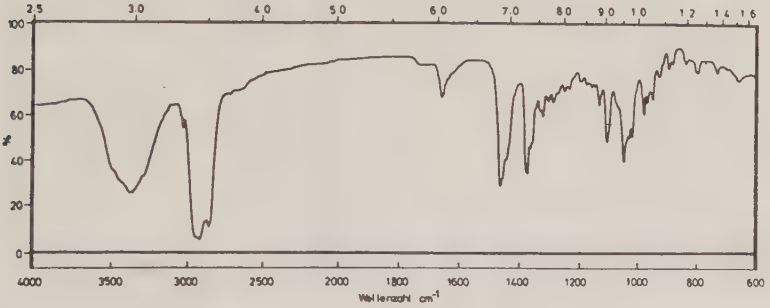


Abbildung 30: IR - Spektrum der isolierten freien Sterine

Das IR - Spektrum der isolierten Sterine deutete somit auf ein Steringemisch aus gesättigten und Δ^5, Δ^{22} - ungesättigten Sterinen sowie einem Sterin mit einem Cyclopropanring hin.

Gesättigte Sterine lassen sich vor allem als Acetate an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten von den ungesättigten Sterinen und diese ihrerseits nach Anzahl und Lage der Doppelbindungen trennen (vgl. COPIUS-PEEREBOOM u. BEEKES, 1965; VROMAN u. COHEN, 1967). Abb. 31 zeigt das DC der acetylierten Costus - Sterine an mit 20 % bzw. 40 % Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten. Danach

liegen in dem Steringemisch gesättigte, Δ^5 - ungesättigte und $\Delta^{5,22}$ - ungesättigte Sterine (Stigmasterin) vor.

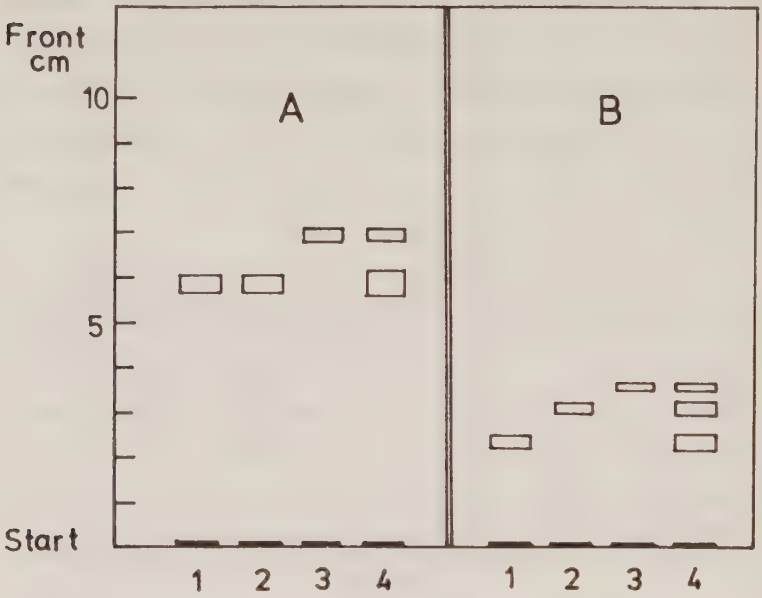


Abbildung 31: DC der acetylierten freien Sterine an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelschichten

A : 20 % Silbernitrat - Kieselgelschicht
System: n-Hexan/Benzol (1 : 1)

B : 40 % Silbernitrat - Kieselgelschicht
System: Chloroform/Petrolether/Eisessig (25 : 75 : 0,5)

1 = Stigmasterinacetat
2 = Cholesterin-, Campesterin- und Sitosterinacetat
3 = Cholestanol- und Campestanolacetat
4 = Die Acetate der isolierten freien Sterine

Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten des Steringemisches wurden die freien Sterine und ihre Acetylderivate gc an einer OV-17 - Säule und einer OV-1 - Kapillarsäule analysiert. Durch Zumischen der Vergleichssterine wurden die im GC erscheinenden Peaks (s. Abb. 32) als Cholesterin,

Pollinastanol, Campesterin/Campestanol, Stigmasterin und Sitosterin identifiziert (s. Tab. 16). Die relativen Retentionszeiten bezogen auf Sitosterin an der OV-17 - Säule stimmten mit den Angaben von ITOH und Mitarb. (1974) sowie JEONG und Mitarb. (1974) überein.

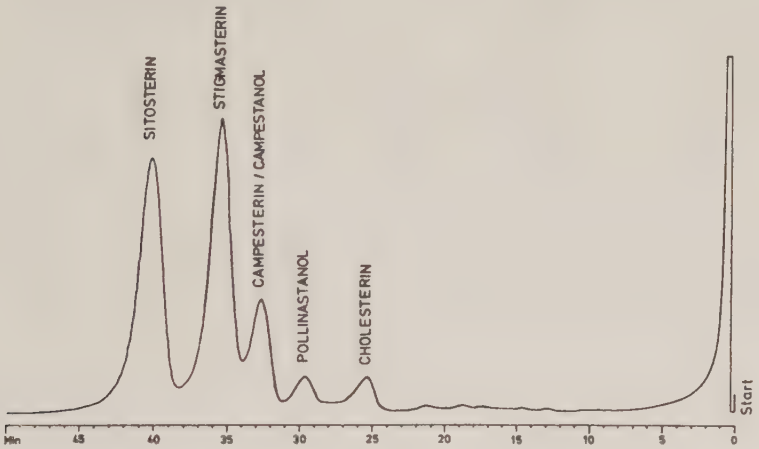


Abbildung 32: GC der isolierten, frei vorliegenden Sterine (Säule: 3 % Silikonöl OV-17, 250 °C, isotherm)

Tabelle 16: Relative Retentionszeit der isolierten Sterine und ihrer Acetate bezogen auf Sitosterin

OV-17: Sitosterin RT 39,5 Min.; OV-1: Sitosterin RT 12,4 Min.

Sterin	OV-17		OV-1	
	frei	Acetat	frei	Acetat
Cholesterin	0,61	0,81	0,65	0,76
Pollinastanol	0,72	0,97	0,74	0,87
Campestanol	0,81	1,08	0,81	0,95
Campesterin	0,81	1,08	0,83	0,97
Stigmasterin	0,88	1,16	0,87	1,10
Sitosterin	1,00	1,33	1,00	1,16

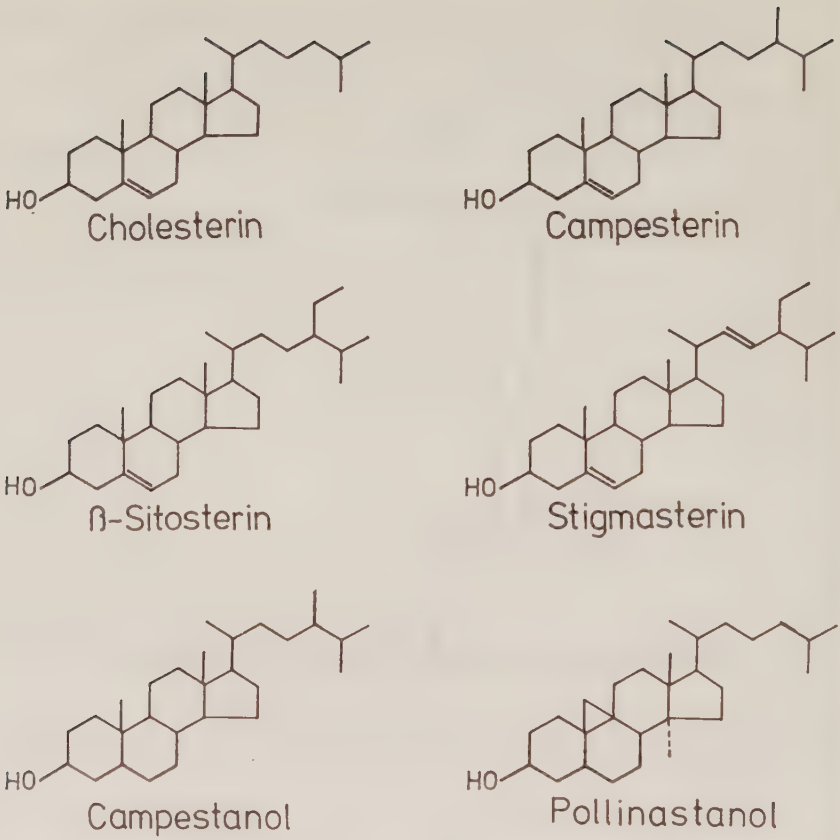
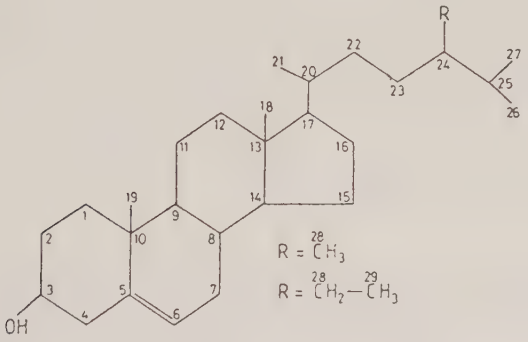


Abbildung 33: Strukturformeln der identifizierten Sterine

Zur Absicherung der dc und gc Analysenergebnisse wurde das Steringemisch einer kombinierten GC/MS - Analyse an der OV-1 - Kapillarsäule unterworfen (vgl. auch SPITELLER, 1966; KNIGHTS, 1967; WYLLIE u. DJERASSI, 1968; ITOH und Mitarb., 1974; JEONG und Mitarb., 1974).

Sterine geben im Massenspektrum einen Molekülpeak. Weitere allgemein auftretende Spaltungsprodukte sind von MERFORT (1980) zusammenfassend diskutiert worden. Sie resultieren " aus der

Sprengung der von den quartären C-Atomen 10 und 13 ausgehenden Bindungen. Werden nur die angulären Methylgruppen eliminiert, so führt dies zur Bildung eines Fragmentes $M^+ - 15$. Als Hydroxysteroide neigen die Sterine weiterhin zur Abspaltung von Wasser, so daß als Bruchstücke die Fragmente $M^+ - H_2O$ und $M^+ - (CH_3 + H_2O)$ auftreten. Weitere charakteristische Bruchstücke der Δ^5 - Sterine sind $M^+ - [H_2O + 67\ (C_5H_7)]$, das durch Verlust von C_1-C_5 entstehen dürfte, $M^+ - [H_2O + 93\ (C_7H_9)]$, das sich nach Eliminierung von C_1-C_7 bildet, $M^+ - [H_2O + 121\ (C_9H_{13})]$, das nach vollständiger Abspaltung der Ringe A und B zustande kommt sowie $M^+ - [H_2O + 108\ (C_8H_{12})]$. Letzteres Bruchstück, dessen Entstehung noch ungeklärt ist, hat bei den freien Sterinen eine geringe, bei den acetylierten Sterinen meistens eine größere Intensität (vgl. KNIGHTS, 1967; WYLLIE und Mitarb., 1977).



Struktur der Δ^5 - Sterine

Anhand der Molpeaks und der genannten Fragmente lassen sich die pflanzlichen Δ^5 - Sterine identifizieren. Da bei diesen Spaltprodukten die für die verschiedenen Sterine charakteri-

stische Seitenkette erhalten bleibt, unterscheiden sich die Massenzahlen dieser Fragmente stets nur durch die Differenz der Massenunterschiede ihrer Seitenkette. Desweiteren tritt eine Anzahl von Bruchstücken auf, die für Δ^5 - Sterine insgesamt charakteristisch sind. Es handelt sich dabei um das Fragment m/z 273, das durch Abspaltung der Seitenkette an C-17 gebildet wird (M^+ - Seitenkette). Durch zusätzliches Abspalten von Wasser aus dem Sterinkern entsteht das Fragment m/z 255, d.h. M^+ - (Seitenkette + H_2O). Weiterhin erfolgt leicht eine Spaltung zwischen den C-Atomen 13 und 17. Dieses Primärspaltprodukt wird weiter abgebaut, wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet (SPITELLER, 1966). Als Spaltprodukte resultieren die Fragmente 231 und 213, d.h. M^+ - (Seitenkette + 42) bzw. M^+ - (Seitenkette + 42 + H_2O). Das Primärspaltprodukt kann jedoch auch durch einen Bruch zwischen C-15 und C-16 weiter abgebaut werden, woraus Spaltprodukte mit den Massenzahlen 246 und 229 resultieren, d.h. M^+ - (Seitenkette + 27) bzw. M^+ - (Seitenkette + 27 + OH^-). Die Fragmente m/z 273, 255, 246, 231, 229 und 213 sind so allen Δ^5 - Sterinen gemeinsam.

Δ^5 - Sterine, die in der Seitenkette eine Doppelbindung tragen (Stigmasterin: $\Delta^{5,22}$), geben sich im Massenspektrum durch das Fragment 271 zu erkennen, das durch Verlust der Seitenkette an C-17 unter gleichzeitiger Umlagerung zweier H-Atome gebildet wird. Außerdem treten bei ihnen charakteristische Peaks bei m/z 314, 296 und 281 auf, die durch Verlust nur eines Teils der Seitenkette entstehen und

durch eine McLafferty - Umlagerung formuliert werden können. Das Fragment 314 entspricht so M^+ - (C_{23} bis C_{27} + 1H) (vgl. u.a. auch KNIGHTS, 1967; JEONG und Mitarb., 1974; NES und Mitarb., 1977; TAKAGI und Mitarb., 1979)".

In Tab. 17 sind die Ergebnisse der GC/MS - Analysen der frei vorliegenden Costus - Sterine wiedergegeben. Die im GC auftretenden sechs Peaks wurden auch hier als Cholesterin (Abb. 34), Campesterin (Abb. 35), Sitosterin (Abb. 36), Stigmasterin (Abb. 37), Campestanol (Abb. 38) und Pollinastanol (Abb. 39) identifiziert.

Im Massenspektrum des gesättigten Campestanols fehlen die für Δ^5 - Sterine charakteristischen aus der Ringspaltung A und B hervorgehenden Fragmente M^+ - (H_2O + 93) und M^+ - (H_2O + 121).

Bei Pollinastanol handelt es sich um ein 14α - Methylsterin mit einem 9,19 - Cyclopropanring. Diese Verbindungen geben im Massenspektrum charakteristische Spaltprodukte, die aus der Öffnung des Cyclopropanringes resultieren, wobei es nach einer McLafferty - Umlagerung zum Verlust des Ringes A und eines Wasserstoffatoms kommt (APLIN u. HORNBY, 1966; AUDIER und Mitarb., 1966; ITOH und Mitarb., 1977; NIELSEN und Mitarb., 1979). Die Entstehung der auf diesem Weg bei Pollinastanol (M^+ = 400) gebildeten typischen Fragmente m/z 288 und 175 sowie m/z 273 und 160 ist in Abbildung 40 wiedergegeben. Als weitere Spaltprodukte treten im Massenspektrum (s. Abb. 39) die für Sterine üblichen Fragmente m/z 385 (M^+ - CH_3), 382 (M^+ - H_2O), 367 [M^+ - (CH_3 + H_2O)], 287 (M^+ - Seitenkette) und 269 [M^+ - (Seitenkette + H_2O)]

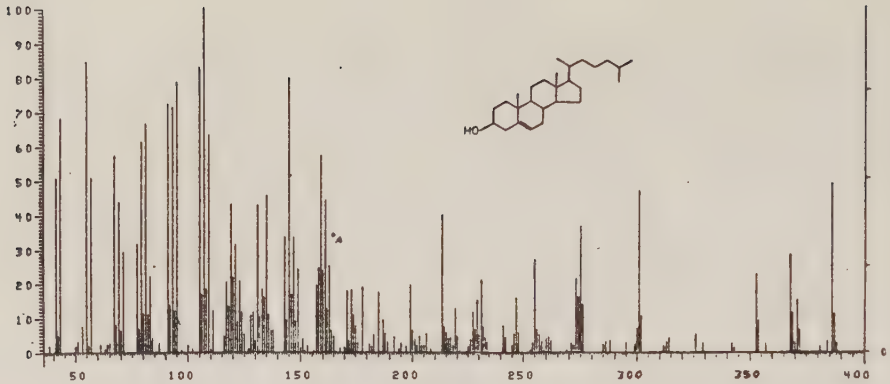


Abbildung 34: Massenspektrum von Cholesterin

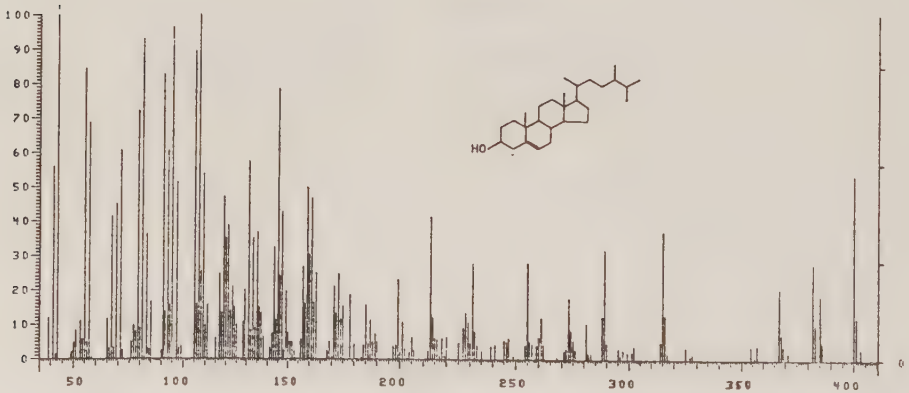


Abbildung 35: Massenspektrum von Campesterin

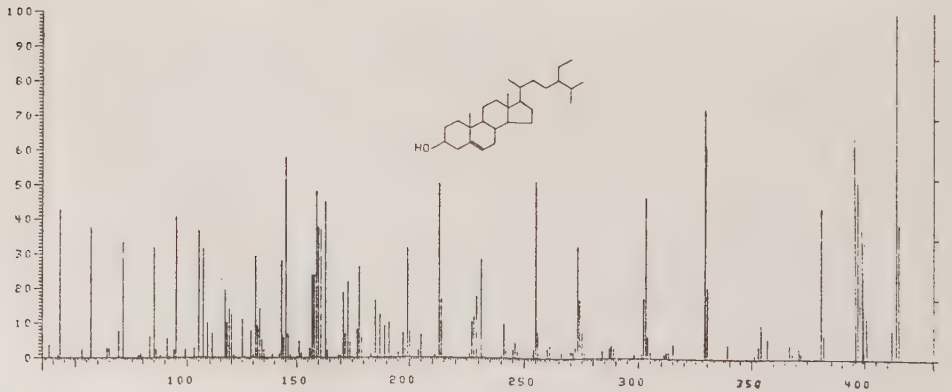


Abbildung 36: Massenspektrum von Sitosterin

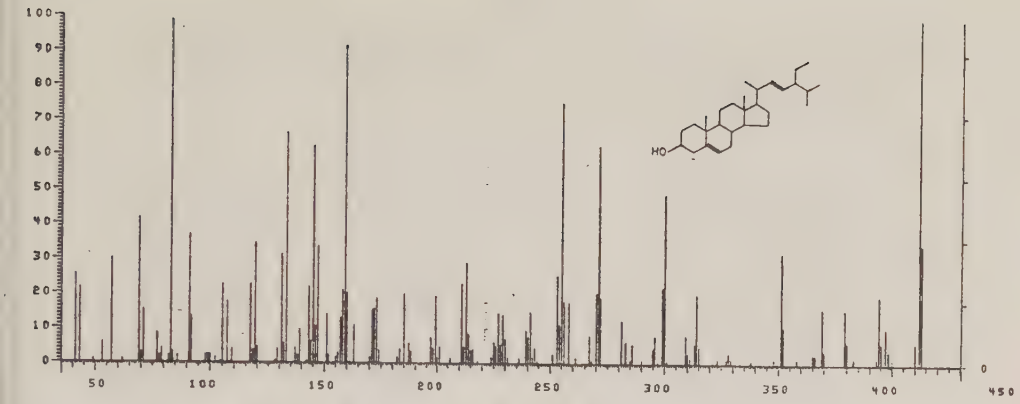


Abbildung 37: Massenspektrum von Stigmasterin

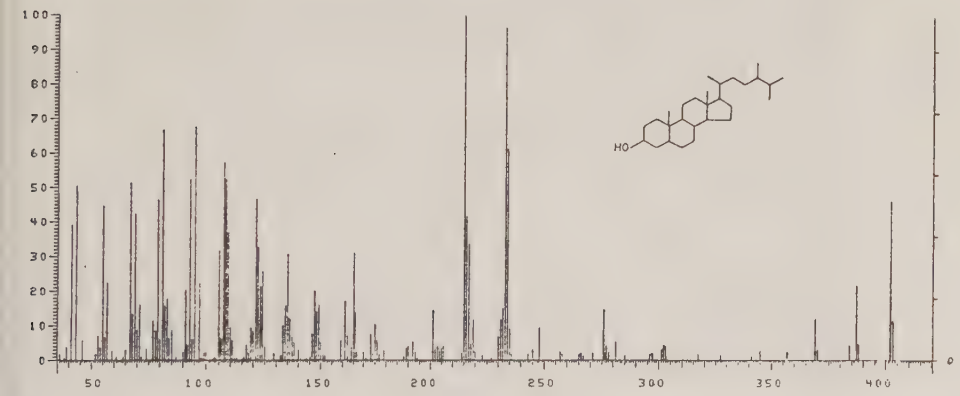


Abbildung 38: Massenspektrum von Campestanol

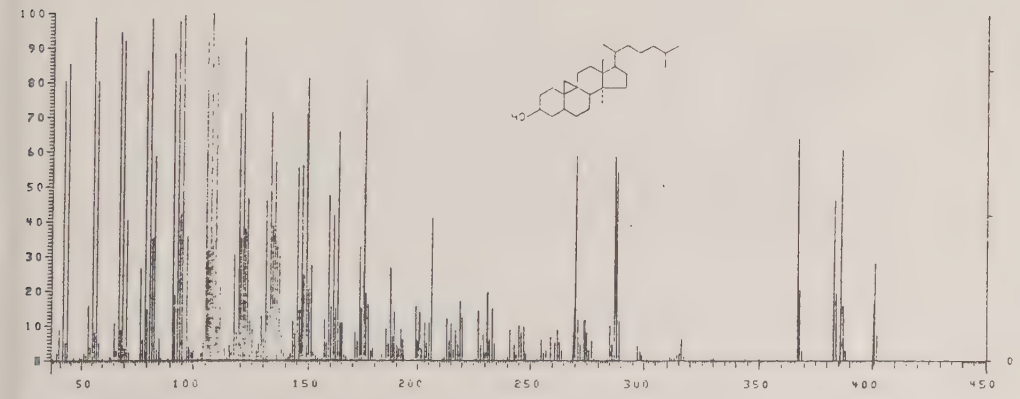


Abbildung 39: Massenspektrum von Pollinastanol

Tabelle 17: Ergebnisse der GC/MS - Analysen der frei vorliegenden Sterine

Fragmentierung	Cholesterin		Campesterin		Stigmasterin		Sitosterin		Campestanol	
	m/e	rel.Int.%	m/e	rel.Int.%	m/e	rel.Int.%	m/e	rel.Int.%	m/e	rel.Int.%
M^+ Molekülion	386	(49)	400	(56)	412	(100)	414	(100)	402	(46)
M^+-CH_3	371	(16)	385	(19)	397	(12)	399	(37)	387	(21)
M^+-H_2O	368	(29)	382	(29)	394	(22)	396	(64)	384	(5)
$M^+-[CH_3+H_2O]$	353	(24)	367	(21)	379	(18)	381	(43)	369	(12)
$M^+-43(C_{25}-C_{27})$	-		-		369	(19)	-		-	
$M^+-[43+H_2O]$	-		-		351	(33)	-		-	
$M^+-[(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		314	(21)	-		-	
$M^+-[H_2O+67]$	301	(48)	315	(37)	327	(2)	329	(73)	317	(3)
$M^+-[CH_3+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		299	(51)	-		-	
$M^+-[H_2O+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		296	(10)	-		-	
$M^+-[CH_3+H_2O+(C_{23}-C_{27})+1H]$	-		-		281	(13)	-		-	
$M^+-[H_2O+93]$	275	(38)	289	(32)	301	(2)	303	(47)	-	
$M^+-[SK(Seitenkette)]$	273	(22)	273	(17)	273	(18)	273	(32)	275	(17)
$M^+-[SK+2H]$	271	(4)	271	(3)	271	(64)	271	(3)	273	(1)
$M^+-[H_2O+108(C_8H_{12})]$	260	(5)	274	(9)	286	(8)	288	(4)	276	(3)
$M^+-[H_2O+121]$	247	(17)	261	(12)	273	(18)	275	(9)	-	
$M^+-[SK+H_2O]$	255	(27)	255	(29)	255	(79)	255	(53)	257	(3)
$M^+-[SK+H_2O+2H]$	-		-		253	(28)	-		-	
$M^+-[SK+27(C_{16}-C_{17})]$	246	(18)	246	(7)	246	(1)	246	(4)	248	(12)
$M^+-[SK+42(C_{15}-C_{17})]$	231	(22)	231	(28)	231	(4)	231	(29)	233	(96)
$M^+-[SK+27+OH^-]$	229	(17)	229	(12)	229	(14)	229	(20)	231	(13)
$M^+-[SK+27+H_2O]$	228	(8)	228	(13)	228	(8)	228	(12)	230	(8)
$M^+-[SK+42+H_2O]$	213	(41)	213	(43)	213	(31)	213	(51)	215	(100)

auf. Ein charakteristisches Spaltprodukt ist weiterhin das Fragment m/z 231, das aus der Abspaltung des Ringes D und der Seitenkette sowie der Methylgruppe an C-14 als Methylengruppe hervorgeht [M^+ - (Seitenkette + C_{15}-C_{17} + CH_2)]. Dieses Fragment ist in Verbindung mit dem Fragment 287, das auf die nicht methylierte Seitenkette hinweist, ein Beleg für die Anwesenheit einer Methylgruppe an C-14.

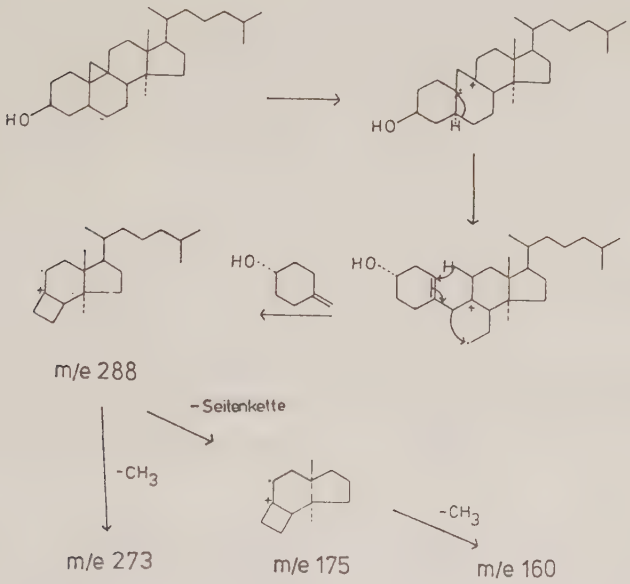


Abbildung 40: Bildung der charakteristischen Fragmente von Pollinastanol

Aufgrund der durchgeführten dc, gc und massenspektrometrischen Untersuchungen handelt es sich bei den in den Rhizomen von Costus spiralis frei vorliegenden Sterinen um die Δ^5 - Sterine Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin und Sitosterin

sowie das gesättigte Campestanol und das Methylsterin Pollinastanol. Die quantitative Zusammensetzung des Steringemisches ist in Tab. 18 S. 134 wiedergegeben.

3. Die verestert vorliegenden Sterine

Zur Identifizierung der veresterten Sterine wurden 250 mg der bei Fraktionierung des Petroletherextraktes gewonnenen Sterinesterfraktion (Teilfraktion II) alkalisch hydrolysiert (s. Exp. Teil S. 158). Durch Ausschütteln mit Petrolether wurden dem Hydrolysat 142 mg an unverseifbaren Bestandteilen entzogen. Diese wurden sc an Kieselgel mit einem Petrolether/Ethylacetat/Toluol - Gemisch (80 : 15 : 5) aufgetrennt, wobei 23,8 mg Sterine dc rein anfielen.

Die qualitative Analyse dieses Steringemisches erfolgte wie bei den frei vorliegenden Sterinen durch DC -, IR -, GC - und GC/MS - Untersuchungen. Danach bilden die verestert vorliegenden Sterine ebenfalls ein Gemisch aus Cholesterin, Pollinastanol, Campesterin, Campestanol, Stigmasterin und Sitosterin.

Die quantitative Zusammensetzung weist allerdings große Unterschiede zu den frei vorliegenden Sterinen auf. Pollinastanol bildet in dem Sterinestergemisch mit 66 % die Hauptkomponente, während der Stigmasterin- und Sitosterinanteil mit 11 bzw. 12 % auffallend gering ist (s. Tab. 18, S. 134).

4. Die glykosidisch gebundenen Sterine

Im DC des Methanolextraktes der Rhizome ließ sich eine LIEBERMANN-BURCHARD positive Substanz nachweisen, bei der es sich aufgrund mitchromatographierter Vergleichssubstanz um Steringlykoside handelte (s.S. 111). Zur Isolierung der glykosidisch gebundenen Sterine wurde der Methanolextrakt, der nach erschöpfender Petroletherextraktion von den freien und veresterten Sterinen befreit wurde (dc Kontrolle), sauer hydrolysiert (s. Exp. Teil S. 158). Im unverseifbaren Anteil konnten danach in verschiedenen DC - Systemen nach Detektion mit LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz Sterine nachgewiesen werden. Zu ihrer Isolierung wurden 130 mg des Unverseifbaren an Aluminiumoxid mit Petrolether/Ether - Gemischen sc aufgetrennt. Dabei fielen 26 mg eines dc einheitlichen Steringemisches an, das bei 136 - 138 °C schmolz.

Die Identifizierung der einzelnen Komponenten des Steringemisches erfolgte wie bei den frei und verestert vorliegenden Sterinen durch DC -, IR -, GC - und GC/MS - Analyse vor und nach Acetylierung. Danach bilden auch die glykosidisch gebundenen Sterine ein Gemisch aus Cholesterin, Pollinastanol, Campesterin, Campestanol, Stigmasterin und Sitosterin.

Die prozentuale Zusammensetzung des Steringemisches entsprach weitgehend dem der frei vorliegenden Sterine (s. Tab. 18).

Tabelle 18: Prozentuale Zusammensetzung der frei, verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine der Rhizome von Costus spiralis

Sterin	Anteil in %		
	frei	verestert	glykosidisch
Cholesterin	3	7	5
Pollinastanol	4	66	6
Campesterin/Campestanol	12	4	13
Stigmasterin	38	11	20
Sitosterin	43	12	56

Die prozentuale Zusammensetzung der isolierten Steringemische wurde jeweils aus dem an der OV-17 - Säule erhaltenen Fraktogramm über einen an den Gaschromatographen angeschlossenen Integrator ermittelt. Für Campesterin und Campestanol, die sich hier nicht trennen, ist ein gemeinsamer Wert angegeben. Dieses kritische Paar trennt sich jedoch an der OV-1 - Kapillarsäule. Hier zeigten beide Sterine etwa dieselbe Peakintensität, so daß Campesterin und Campestanol mengenmäßig jeweils zu etwa gleichen Teilen in den Steringemischen vorlagen.

5. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine sowie der Anteile der frei, verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine

In den vorhergehenden Abschnitten wurde gezeigt, daß die Rhizome von C. spiralis neben frei vorliegenden Sterinen auch Sterinester und -glykoside führen. Im Folgenden soll

der Gesamtsteringehalt und der Anteil dieser Sterinderivate an den Gesamtsterinen ermittelt werden.

Die quantitative Bestimmung der Sterine erfolgte photometrisch nach dem Verfahren von EICHENBERGER u. GROB, 1970 (vgl. auch WILLUHN u. KÖSTENS, 1975; RICHTER u. WILLUHN, 1977). Sterine geben mit LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz eine grün-blaue Färbung, deren Intensität bei 680 nm in dem getesteten Bereich von 0,2 - 0,8 mg pro 3,10 ml Reagenzlösung (1,00 ml Eisessig, 2,00 ml Essigsäureanhydrid und 0,10 ml konz. Schwefelsäure) dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz folgt und so für eine photometrische Gehaltsbestimmung geeignet ist.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden die aus den Costus - Rhizomen isolierten freien Sterine herangezogen. Diese wurden, wie später bei der Sterinbestimmung, an Kieselgel - Folien mit Chloroform/Ethanol abs. (99 : 1) chromatographiert. Die Sterinzone wurde mit dem DESAGA - Elutor quantitativ eluiert und nach Reagenzzugabe 30 Min. lang bei 24 ^{o}C gehalten. Danach wurde bei 680 nm die Extinktion gegen die Reagenzlösung gemessen (Erstellung der Eichkurve und Abbildung s. Exp. Teil S. 160).

Zur quantitativen Bestimmung der Sterine wurden 30 mg getrocknete und gemahlene Rhizome erschöpfend mit Aceton extrahiert. In diesem Extrakt sind die freien, veresterten und glykosidisch gebundenen Sterine enthalten.

Zur Erfassung der Gesamtsterine wurde ein Teil des Acetonextraktes sauer hydrolysiert, ein aliquoter Teil des unverseifbaren Anteils wie bei der Erstellung der Eichkurve über

DC - Folien aufgetrennt, die Sterinzone eluiert und nach Reagenzzugabe photometrisch vermessen.
Ein weiterer Teil des Acetonextraktes wurde alkalisch verseift und nach analoger Weiterbehandlung der Gehalt an freien und veresterten Sterinen ermittelt.
Schließlich wurden die frei vorliegenden Sterine im Acetonextrakt direkt bestimmt, indem ein aliquoter Teil dc aufgetrennt, die Zone der frei vorliegenden Sterine eluiert und photometrisch erfaßt wurde.
Aus den auf diese Weise bestimmten Gehalten an Gesamtsterinen, freien Sterinen und frei und verestert vorliegenden Sterinen lassen sich der Gehalt an veresterten und glykosidisch gebundenen Sterinen durch Differenzbildung ermitteln (s. Tab. 19).
Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurden die frei vorliegenden Sterine und ihre Derivate nach einem modifizierten Extraktionsweg quantitativ bestimmt. Hierbei wurden die freien und veresterten Sterine aus 30 g Droge mit Petrolether erschöpfend extrahiert und anschließend die glykosidisch gebundenen Sterine mit Aceton ausgezogen. In einem Teil des Petroletherextraktes wurden wie beschrieben die freien Sterine und nach alkalischer Hydrolyse die verestert und frei vorliegenden Sterine gemeinsam quantitativ bestimmt.

Aus einem zweiten Teil des Petroletherextraktes wurden die freien Sterine mit Digitonin ausgefällt und im Extraktrückstand nach alkalischer Verseifung der Gehalt an veresterten Sterinen alleine ermittelt.

Schließlich wurden im Acetonextrakt die glykosidisch gebundenen Sterine nach saurer Hydrolyse analog photometrisch bestimmt. Aus den so ermittelten Gehalten an freien und veresterten Sterinen aus dem Petroletherextrakt und glykosidisch gebundenen Sterinen aus dem Acetonextrakt kann zur Kontrolle wieder der Gesamtgehalt berechnet werden (s. Tab. 19).
Bei jeder Bestimmung wurden jeweils drei Parallelanalysen durchgeführt und die Ergebnisse für die Gehaltsangaben gemittelt. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tabelle 19 zusammengefaßt. Die Abweichungen der durch Differenz- und Summenbildung ermittelten Gehaltswerte und der methodische Fehler, der durch Zumischen einer definierten Sterinmenge zu den Extrakten bestimmt wurde, lag unter einer Fehlergrenze von 4 %.

Tabelle 19: Ergebnisse der Sterin - Gehaltsbestimmungen

Fraktion	Gehalt in mg pro 100 g Droge		
	Aceton-extrakt	Petrolether-extrakt	Aceton-extrakt aus entfetteter Droge
Gesamtsterine	133,0	131,5*	
freie Sterine	51,8	52,8	
veresterte Sterine	11,9*	11,6	
freie u. veresterte Sterine	63,7	64,4	
glykosidisch gebund. Sterine	69,3*		67,1

* = rechnerisch ermittelte Mengen

Der Gesamt - Steringehalt der unterirdischen Organe von Costus spiralis wurde mit 133 mg pro 100 g Droge (= 0,13 % vom Trockengewicht) ermittelt. Die Hauptmenge der Sterine liegt glykosidisch gebunden vor (68,2 mg, entsprechend 52 % der Gesamtsterine). Die freien Sterine stellen mit 52,3 mg pro 100 g Droge einen Anteil von 39 %, wogegen die Sterinester mit nur 9 % (11,7 mg / 100 g Droge) an den Gesamtsterinen beteiligt sind.

V. Identifizierung und quantitative Bestimmung von frei vorliegendem Diosgenin

Bei der sc Auftrennung des Petroletherextraktes zur Isolierung der Sterine wurde eine Fraktion erhalten, in der eine mit Molybdatophosphorsäure sich rotviolett färbende und in der Laufhöhe mit Diosgenin (hR_f 21, s. Abb. 29 S. 119) überein stimmende Komponente angereichert vorlag (Fraktion V, s. Tab. 20, S. 157).

Zur Isolierung dieser Substanz wurden 135 mg dieser Fraktion erneut an Kieselgel sc aufgetrennt. Durch Umkristallisation aus Aceton konnten aus den vereinigten entsprechenden Fraktionen 25 mg dieser Substanz dc rein gewonnen werden. Sie stimmte in Laufhöhe und Färbung mit EHRLICH'S - Reagenz und Anisaldehyd/H_2SO_4 in mehreren DC - Systemen im direkten Vergleich mit Diosgenin überein. Die langen, weißen Nadeln schmolzen bei 206 - 208 °C und zeigten eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = - 128,3^{\circ}$. Diese Werte und auch das IR - Spektrum stimmten mit denen von Diosgenin überein. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Schmelzpunkt und spezifische Drehung des hergestellten Acetylderivats (198 - 199,5 °C, $[\alpha]_D^{20}$ = - 121,1°) entsprachen den Werten für Diosgeninacetat.
Somit liegt Diosgenin in den unterirdischen Organen von Costus spiralis auch in freier Form vor.
Zur Gehaltsbestimmung des frei vorliegenden Diosgenins wurden 47,1 mg Petroletherextrakt (entsprechend 5,00 g getrocknete Droge) in 100,0 ml Chloroform gelöst, 0,2 ml dieser Lösung an 2 Kieselgel 60 - Folien aufgetrennt und der Diosgeningehalt wie auf Seite 117 beschrieben spektralphotometrisch bestimmt. Der aus der Eichkurve ermittelte Gehalt an frei vorliegendem Diosgenin lag bei 0,07 % bezogen auf das Trockengewicht.

VI. Diskussion

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, werden Costus spiralis und andere Costus - Arten in der Volksmedizin südamerikanischer Länder als diuretisch und antibiotisch wirkendes Mittel angewendet. Eine chemische Bearbeitung der südamerikanischen Costus - Arten ist noch nicht erfolgt, so daß die Wirkstoffrage hier derzeit noch ungeklärt ist. Aus der Gattung Costus ist unseres Wissens bisher nur die indische Costus speciosus analysiert worden, deren Rhizome dort ebenfalls volksmedizinisch verwendet werden (MEDICINAL PLANTS OF INDIA, 1976). Sie führen beträchtliche Mengen an Diosgeninglykosiden, so daß sie als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des für partialsynthetische Zwecke benötigten Diosgenins diskutiert werden (s. Einleitung).

Die mit Blättern, Stengeln und Rhizomen der südamerikanischen C. spiralis durchgeführten Nachweisreaktionen auf Alkaloide, Flavonoide, Gerbstoffe, ätherisches Öl und Saponine ergaben, daß diese Organe keine Alkaloide, kein ätherisches Öl und auch keine nennenswerten Mengen an Flavonoiden und Gerbstoffen aufweisen (s. Tab. 14, S. 110). Alle drei Organe führen jedoch Steroidsaponine, die besonders in den Rhizomen akkumuliert sind.
Die DC - Analyse ergab nach Detektion mit EHRLICH'S - Reagenz, daß alle drei Organe vier Furostanolglykoside führen. Nach Hydrolyse der aus den Rhizomen gewonnenen und gereinigten Saponinfraktion wurde als Aglykon der vier Glykoside Diosgenin isoliert und identifiziert. Die Analyse der Zucker ergab, daß an der Glykosidbildung lediglich Glucose und Rhamnose beteiligt sind. Die südamerikanische C. spiralis führt so wie die indische C. speciosus in den Rhizomen das Steroidsapogenin Diosgenin. Die Rhizome auch dieser Costus - Art führen vier Steroidglykoside, von denen ebenfalls zwei als Hauptsaponine auftreten. Anders als bei C. speciosus liegen diese bei C. spiralis jedoch nicht als Spirostanol-, sondern als Furostanolglykoside vor. Das Vorkommen von Furostanolglykosiden in C. speciosus wird von TSCHESCHE u. PANDEY (1978) ausdrücklich verneint, während wir in C. spiralis keine Spirostanolglykoside nachweisen konnten. Die beiden Hauptsaponine wurden von den Autoren als die Diosgeninsaponine Gracillin und Dioscin identifiziert, deren Zuckerkette aus den Zuckern Glucose und Rhamnose gebildet wird (2 Mol Glucose, 1 Mol Rhamnose

bzw. 1 Mol Glucose, 2 Mol Rhamnose). Da bei den Steroidglykosiden aus C. spiralis qualitativ dieselben Zucker vorliegen, ist es möglich, daß es sich bei zwei von den vier Furostanolglykosiden aus C. spiralis um Gracillinosid und Dioscinosid, den biosynthetischen Vorstufen von Gracillin und Dioscin handelt, die nach Abspaltung der Glucose von C-26 spontan unter Schließung des Ringes F entstehen würden (KIYOSAWA und Mitarb., 1968; JOLY und Mitarb., 1969; TSCHESCHE und Mitarb., 1969). Wegen fehlender Vergleichssubstanzen konnte diese Möglichkeit jedoch nicht überprüft werden.

Neben dem in Form der bisdesmosidischen Furostanolglykoside vorliegenden Diosgenin wurde aus den Rhizomen auch frei vorliegendes Diosgenin isoliert. Der Diosgeningehalt der getrockneten Rhizome wurde spektralphotometrisch mit 0,43 % ermittelt (freies Diosgenin 0,07 %, glykosidisch gebundenes Diosgenin 0,36 %). Dieser Gehalt ist somit wesentlich niedriger als der der C. speciosus - Rhizome, die bis zu 2,4 % Diosgenin führen (PANDEY und Mitarb., 1972; BEDI und Mitarb., 1976; SINGH und Mitarb., 1980). Eine Verwendung als Rohstoffquelle zur Partialsynthese von Steroidhormonen, wie sie für C. speciosus diskutiert wird, kommt dieser südamerikanischen Costus - Art somit nicht zu. Die Blätter und Stengel, in denen ebenfalls die vier Furostanolglykoside dc nachgewiesen wurden, haben im Vergleich zu den Rhizomen einen noch bedeutend geringeren Spirostanolgehalt.

Neben den Spirostanolglykosiden wurde in den Rhizomen von C. speciosus ein Steringlykosid nachgewiesen und als Sito-

steringlykosid identifiziert (PANDEY u. DASGUPTA, 1970; CHAKRAVARTI und Mitarb., 1976; SARIN und Mitarb., 1976; TSCHESCHE u. PANDEY, 1978). Auch wir konnten in den Rhizomen von C. spiralis ein Steringlykosid nachweisen, bei dem es sich jedoch um ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin, Campestanol, Sitosterin, Stigmasterin und Pollinastanol handelt, in dem Sitosterin lediglich mit 56 % die Hauptkomponente stellt (s. Tab. 18, S. 134). Sicherlich dürfte eine genauere GC - und GC/MS - Analyse auch bei C. speciosus zum Auffinden weiterer Sterine führen, wie dies allgemein bei Pflanzen üblich ist. Die genannten sechs Sterine kommen in den Rhizomen von C. spiralis auch frei und verestert vor. Während die prozentuale Zusammensetzung des frei vorliegenden Steringemisches weitgehend der der Steringlykoside entspricht, dominiert bei den Sterinestern mit 66 % Pollinastanol (s. Tab. 18, S. 134). Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein bisher nur selten gefundenes 14α - Methylsterin mit einem 9,19 - Cyclopropanring, das erstmals in den sechziger Jahren aus Pollen von Hypochoeris radicata und Taraxacum dens leonis isoliert wurde (HÜGEL und Mitarb., 1964; DEVEYS u. BARBIER, 1967). Es handelt sich um eine Biosynthesevorstufe von Cholesterin, dem zentralen Sterin im Steroidstoffwechsel von Pflanze und Tier, wie durch Markierungsversuche an Nicotiana tabacum - Blättern von DEVEYS und Mitarb. (1969) gezeigt werden konnte. Für die in der Seitenkette alkylierten typischen Phytosterine stellt es dagegen keine Vorstufe dar.

Der Gesamtgehalt der Sterine wurde photometrisch mit 0,13 % ermittelt und entspricht damit der Größenordnung, wie er bisher allgemein auch in anderen Pflanzen gefunden worden ist. Darüber hinaus wurde der Anteil der freien, der veresterten und der glykosidisch gebundenen Sterine an den Gesamtsterinen ermittelt. Die Hauptmenge entfällt mit 52 % auf die als Glykoside vorliegenden Sterine, während die frei vorliegenden 39 % und die veresterten Sterine nur 9 % der Gesamtsterine stellen (s.S. 138).

Bei den erstmals in einer südamerikanischen Costus - Art nachgewiesenen Steroidglykosiden handelt es sich um Verbindungen, die bei C. speciosus und auch in der Gattung Solanum für ein vielseitiges biologisches und pharmakologisches Wirkungsspektrum verantwortlich gemacht werden. Diese neutralen Steroidsaponine besitzen eine antiphlogistische und antiarthritische Wirkung, die qualitativ derjenigen von Betamethason entspricht, ohne jedoch dessen Wirkungsstärke zu erreichen. Neben stark diuretischen Eigenschaften ist weiterhin eine antimikrobielle und cytotoxische Wirkung beschrieben worden (TSCHESCHE u. WULFF, 1965; PARIKH und Mitarb., 1970; BHATTACHARYA und Mitarb., 1971; PANDEY und Mitarb., 1972; SINGH und Mitarb., 1972; RAVIKUMAR und Mitarb., 1979; WILLUHN u. KÖTHE, 1981). Durch den Nachweis der Steroidsaponine in Costus spiralis hat damit eine Reihe von empirisch festgestellten Wirkungen der volksmedizinisch verwendeten Droge eine stoffliche Erklärung gefunden.

VI. Zusammenfassung

1. In Stengeln, Blättern und Rhizomen von Costus spiralis wurden vier Furostanolglykoside nachgewiesen, die nach Hydrolyse Diosgenin als Aglykon liefern (Identifizierung über DC, Schmp., Mischschmp., spez. Drehung, IR - Spektrum). Die an der Glykosidbildung beteiligten Zucker wurden dc und nach Oberführung in die Alditolacetate gc als Glucose und Rhamnose identifiziert.
   Daneben wurde aus den Rhizomen auch frei vorliegendes Diosgenin isoliert und identifiziert.

2. Der Diosgeningehalt der Rhizome wurde spektralphotometrisch unter Anwendung der Farbreaktion mit Antimon(III)-chlorid in Perchlorsäure mit 0,43 % ermittelt (freies Diosgenin 0,07 %, glykosidisch gebundenes Diosgenin 0,36 %).

3. Die Sterine der Rhizome von Costus spiralis wurden durch GC - und GC/MS - Analyse als ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin, Campestanol, Sitosterin, Stigmasterin und Pollinastanol identifiziert. Sitosterin stellt mit 56 % die Hauptkomponente. Bei Pollinastanol handelt es sich um ein seltenes 14α - Methylsterin mit einem 9,19 - Cyclopropanring, das erstmals in den sechziger Jahren aus Pollen von Hypochoeris radicata und Taraxacum dens leonis isoliert wurde.
   Die genannten Sterine liegen in den Rhizomen frei, verestert und glykosidisch gebunden vor.

4. Der Gesamtgehalt der Sterine in den Rhizomen wurde photometrisch mit 0,13 % bestimmt. Davon entfallen 52 % auf die glykosidisch gebundenen, 39 % auf die frei und 9 % auf die verestert vorliegenden Sterine.

5. Die bekannten biologischen und pharmakologischen Wirkungen der Steroidglykoside werden im Zusammenhang mit der volksmedizinischen Verwendung von Costus spiralis diskutiert. Die identifizierten Furostanolglykoside können danach als die wesentlichen Wirkstoffe von Costus spiralis angesehen werden, zumal weitere Wirkstoffgruppen (Alkaloide, ätherisches Öl) nicht bzw. (Flavonoide, Gerbstoffe) nur in Spuren nachgewiesen werden konnten.

VIII. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben

Die allgemeinen Angaben zu den spektroskopischen Methoden, den Bestimmungen der physikalischen Konstanten und den chromatographischen Methoden s.S. 80 ff..

2. Analytische Dünnschichtchromatographie, Trennsysteme und Detektionsverfahren

2.1. DC der Steroidsaponine und deren Aglyka

System 1 : n-Butanol/Ethanol/Wasser (5 : 1 : 1)
(DRAGALIN u. KINTYA, 1975)

System 2 : Chloroform/Methanol/Wasser (65 : 35 : 10)
(KAWASAKI und Mitarb., 1974)

System 3 : n-Hexan/Aceton (8 : 2)
(JAIN, 1976)

System 4 : Chloroform/Ether/Essigsäure (97 : 2,5 : 0,5)
Schicht: Kieselgel G, imprägniert mit ca. 8 % Silbernitrat, Aktivierung bei 110 °C, 20 Min..
(DAWIDAR und Mitarb., 1973)

Die Systeme 1 und 2 eignen sich am besten zur Auftrennung der Steroidsaponine, die Systeme 3 und 4 zur DC ihrer Aglyka.

Zur Detektion wurden folgende Sprühreagenzien herangezogen:

a) EHRLICH'S Reagenz (STAHL, 1962; HEACOCK u. MAHON, 1965)
1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd + 75 ml Methanol + 25 ml 36 %ige Salzsäure. Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5 - 10 Min. lang auf ca. 110 °C erwärmt.

b) Anisaldehyd - Schwefelsäure (STAHL, 1962)

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Eisessig + 2 ml konz. Schwefelsäure. Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5 - 10 Min. lang auf ca. 110 °C erwärmt.

c) Schwefelsäure p.a.

Zur Verkohlung der organischen Komponenten werden die DC - Platten nach dem Besprühen 15 - 30 Min. lang auf 150 °C erhitzt.

2.2. DC der Zucker

Fließmittel: n-Butanol/Aceton/Phosphatpuffer pH 5 (4 : 5 : 1);
Schicht: Kieselgur (WALDI, 1965)
Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit p-Anisidin - Reagenz (3 g p-Anisidinhydrochlorid (MERCK) + 97 ml wassergesättigtes n-Butanol; PETRE und Mitarb., 1976). Nach dem Besprühen wird bis zur guten Farbdifferenzierung 5 - 10 Min. lang auf ca. 110 °C erwärmt.

2.3. DC der Sterine

System 1 : Petrolether (40 - 60 °C)/Ethylacetat/Benzol (80 : 15 : 5); (SCHREIBER u. OSSKE, 1962)

System 2 : Chloroform/Ethanol abs. (99 : 1) (EICHENBERGER u. GROB, 1970)

System 3 : n-Hexan/Benzol (1 : 1)
Schicht: Kieselgel 60 Alufolien (MERCK), imprägniert mit 20 % Silbernitrat (EVANS, 1973)

Dieses System wurde zur Auftrennung der acetylierten Sterine benutzt. Es differenziert die Verbindungen nach Anzahl und

Lage ihrer Doppelbindungen. Zur Imprägnierung der DC - Folien mit Silbernitrat wurden diese 2 Min. lang in eine 20 %ige wäßrige Silbernitratlösung eingetaucht. Nach Trocknen bei Zimmertemperatur blieben die Folien 30 Min. lang bei 110 °C im Trockenschrank. Die Herstellung sowie Aufbewahrung der mit $AgNO_3$ imprägnierten Folien erfolgte unter Lichtausschluß.

System 4 : Chloroform/Petrolether (40 - 60 °C)/Eisessig (25 : 75 : 0,5); Schicht: Kieselgel 60 Alufolien (MERCK), imprägniert mit 40 % Silbernitrat (COPIUS-PEEREBOOM u. BEEKES, 1965)

In diesem System ließ sich Stigmasterin als Acetat aus dem Gemisch der übrigen Sterinacetate abtrennen.

Die Detektion erfolgte jeweils mit Molybdatophosphorsäure - oder LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz.

a) LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz

Acetanhydrid/Schwefelsäure konz. (10 : 1). Nach Besprühen und Erwärmen bei 110 °C für 3 - 4 Min. geben die Δ^5 - Sterine das charakteristische Farbspiel von rot, rotviolett über blau nach grün.

b) Molybdatophosphorsäure - Reagenz

Gleiche Anteile Schwefelsäure konz. und Phosphorsäure konz. + 10 % Wasser + 2 % Phosphormolybdänsäure. Nach Erhitzen der besprühten Platten bei 110 °C für 5 Min. färben sich die Δ^5 - Sterine blauviolett, ihre Ester braunviolett (FISCHER u. HERTEL, 1968).

3. Gaschromatographie

Verwendet wurden der Gaschromatograph F 22 in Kombination mit dem Schreiber Typ 56 und dem Integrator M-1 der Fa. PERKIN-ELMER, der Gaschromatograph Typ 5710 A mit dem Schreiber 7123 A der Fa. HEWLETT-PACKARD sowie der Gaschromatograph VARIAN Typ 2700. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm / Min.. Als Trägergas diente, soweit nichts anderes angegeben, gereinigter Stickstoff. Alle Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet.

3.1. GC der Zucker als Alditolacetate

Glassäule, Länge 2 m, Innendurchmesser 3 mm; Stationäre Phase: 3 % Silikonöl OV-225 auf Gas-Chrom Q, 100 - 120 mesh.
Injektor- und Detektortemperatur: 200 °C bzw. 250 °C
Säulentemperatur: 190 °C isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 40 ml N_2 / Min.
RT Rhamnitolacetat: 8,2 Min.
RT Glucitolacetat: 36,4 Min.

3.2. GC der Sterine

System 1 : Glassäule, Länge 2 m, Innendurchmesser 2,5 mm; Stationäre Phase: 3 % Silikonöl OV-17 auf Gas-Chrom Q, 100 - 120 mesh
Injektor- und Detektortemperatur: 280 °C bzw. 300 °C
Säulentemperatur: 250 °C isotherm
Strömungsgeschwindigkeit: 30 ml N_2 / Min.
RT Sitosterin: 39,5 Min.

System 2 : Glaskapillarsäule, Länge 15 m
Stationäre Phase: Silikonöl OV-1
Injektor- und Detektortemperatur: 270 °C bzw. 300 °C
Säulentemperatur: 250 °C isotherm
Trägergas: Helium 1 bar
RT Sitosterin: 12,4 Min.

4. Derivatisierungen

4.1. Acetatbildung

Die Acetylderivate wurden nach der von MATSUO und Mitarb. (1972) beschriebenen Methode hergestellt.
50 mg der betreffenden Substanz wurden in einer Mischung von 1,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurden die Acetate 5 mal mit jeweils 3 ml Chloroform p.a. ausgeschüttelt. Die über Natriumsulfat getrocknete Chloroformphase wurde im Vakuum abgezogen. Notwendige Reinigungen erfolgten durch Umkristallisation, durch SC an Kieselgel oder präparative DC an Kieselgel - Alufolien.

4.2. Bildung der Alditolacetate

Die Reduktion der Zucker und die anschließende Acetylierung wurde in Anlehnung an JANSSON und Mitarb. (1976) durchgeführt.
3 mg Zucker wurden in 2 ml Wasser gelöst und mit 10 mg Natriumborhydrid versetzt. Nach 2 Std. wurde die Lösung mit sauerem Ionenaustauscher (Dowex 50) auf pH 3,5 gebracht, filtriert,

im Vakuum eingedampft, 2 ml Methanol zugesetzt und erneut destilliert. Die Methanoldestillation wurde 3 mal wiederholt. Die entstandenen Zuckeralkohole wurden sofort wie angegeben acetyliert.

5. Herkunft, Ernte, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials

Costus spiralis wurde von natürlichen Wuchsorten in Brasilien geerntet. Die noch nicht blühenden Pflanzen wurden in den Monaten Januar und Juni 1977 in den Wäldern bei Peruibe, einem Küstenort südlich von Santos, ausgegraben.*

Die in Rhizome, Stengel und Blätter separierten Pflanzen wurden 20 Std. lang bei ca. 50 °C im Umlufttrockenschrank getrocknet und nach weiterer, vollständiger Lufttrocknung per Luftpost versand.
Bis zur Extraktion lagerte die Droge maximal zwölf Monate in pergamentierten Papiertüten bei - 20 °C. Die jeweils hergestellten Petrolether- und Methanolextrakte wurden bis zur Aufarbeitung bei - 20 °C unter Stickstoff aufbewahrt.

---

*Herrn Apotheker Dr. G. Willinger danke ich für die Beschaffung der Droge und Herrn Dr. F. Seidel, Akad. Dir. am Botanischen Garten der Universität Marburg/Lahn, für die systematische Bestimmung der Pflanze an ihren natürlichen Wuchsorten.

6. Die Steroidsaponine der Rhizome

6.1. Gewinnung der Steroidsaponinfraktion

964 g getrocknete und gemahlene Rhizome von Costus spiralis wurden im Soxhletverfahren 60 Std. lang mit Petrolether (40 - 60 °C) entfettet und anschließend mit Methanol erschöpfend ausgezogen. Ausbeute: 60,8 g eines dunkelbraunen, hochviskosen Extraktes, entsprechend 6,3 % vom Rhizom - Trockengewicht. Dieser Rückstand wurde dc auf Steroidsaponine untersucht.

Zur Reinigung dieser Fraktion wurden in Anlehnung an KAWANO und Mitarb. (1977) 50 g Extrakt in wenig Wasser gelöst, auf eine Säule mit 500 g Amberlite CG 50 Typ I (Fa. SIGMA) gegeben und mit 3 l 96 %igem Ethanol vollständig eluiert (DC - Kontrolle). Das Eluat wurde auf ein Volumen von 400 ml eingeengt und die Steroidsaponine aus der gerade noch klaren Lösung mit dem fünffachen Volumen Ether ausgefällt. Danach fielen 9,4 g einer sirupösen Rohsaponinfraktion an, die sc weiter gereinigt wurde.

8 g dieses angereicherten Rückstandes wurden an 600 g Kieselgel 60 (MERCK) mit 5000 ml n-Butanol/Ethanol/Wasser (5 : 1 : 1) sc aufgetrennt. Es wurden Fraktionen von 18 ml aufgefangen und nach DC - Kontrolle die Steroidsaponine enthaltenden Teilfraktionen vereinigt (Rückstand: 370 mg). Diese bereits fast reine Fraktion wurde unter denselben Bedingungen nochmals an Kieselgel 60 sc gereinigt. Danach lagen 180 mg eines amorphen, dc - reinen Steroidsaponingemisches vor, das sich aus vier Furostanolglykosiden und zwei bei der Aufarbeitung entstandenen Spirostanolglykosiden zusammensetzte.

6.2. Isolierung von Diosgenin

100 mg der Steroidsaponinfraktion wurden mit 100 ml 2n methanolischer Salzsäure 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert. Das mit stark basischem Ionenaustauscher (MERCK) neutralisierte und auf etwa die Hälfte des Volumens eingeengte Hydrolysat wurde nach Zugabe des gleichen Volumens Wasser 10 mal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der Chloroformrückstand wurde sc an 100 g Alumina WOELM N Super I aufgetrennt. Eluiert wurde mit Petrolether und Petrolether/Ether - Gemischen mit allmählich steigendem Etheranteil bis 60 %. Die 10 ml Teilfraktionen wurden im System n-Hexan/Aceton (8 : 2) auf ihre Zusammensetzung untersucht. Die Fraktionen, die einen mit Anisaldehyd/H_2SO_4 braungelb gefärbten Fleck (hR_f 57) zeigten, wurden vereinigt. Nach Abziehen des Elutionsmittels fielen weiße Kristalle aus, die in Aceton p.a. umkristallisiert, dc einheitliche, lange Nadeln bildeten und den Analysen zugeführt wurden.

6.3. Quantitative Bestimmung von Diosgenin

6.3.1. Photometrische Gehaltsbestimmung

Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung der nach Zugabe von 25 %igem Antimon(III)-chlorid in 60 %iger Perchlorsäure auftretenden Farblösung unter exakt eingehaltenen Bedingungen (SOFOWARA u. HARDMAN, 1974; WILLUHN u. KÖTHE, 1981).

Die getrockneten und pulverisierten Rhizome wurden mit Methanol 60 Std. lang erschöpfend im Soxhlet extrahiert. Der 1,0 g Droge entsprechende Rückstand wurde mit 10 ml

2n methanolischer HCl 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert und nach Neutralisation mit NaOH auf die Hälfte des Volumens eingeengt. Nach Zusatz des gleichen Volumens Wasser wurde 10 mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand der organischen Phase wurde in einem Meßkolben zu 20,0 ml Chloroform p.a. gelöst. 0,2 ml dieser Lösung wurden mit dem DESAGA - Mikrodoser auf zwei Kieselgel 60 - Folien (MERCK) aufgetragen und mit n-Hexan/Aceton (8 : 2) präparativ aufgetrennt. In Höhe des mitchromatographierten und mit Anisaldehyd/H_2SO_4 detektierten, authentischen Diosgenins wurden zwei Streifen ausgeschnitten und mit je 15 ml Chloroform/Methanol (9 : 1), wie bei der präparativen DC beschrieben, eluiert. Der Rückstand wurde in einem Schliffgläschen mit 20 µl einer Mischung aus Chloroform/Ethanol abs. (1 : 1) sowie 5,0 ml 25 % Antimon(III)-chlorid in 60 %iger Perchlorsäure 2 Min. lang intensiv geschüttelt. Nach genau weiteren 8 Min. wurde gegen das Reagenz bei 498 nm die aufgetretene gelbliche Färbung gemessen und die Gehalte einer Eichkurve entnommen. Es wurden jeweils drei Bestimmungen durchgeführt und für die Gehaltsangaben gemittelt.

6.3.2. Erstellung der Eichkurve

Die Eichkurve wurde mit 1,0 mg isoliertem Diosgenin aufgestellt, das in einem Meßkölbchen zu 5,0 ml Chloroform p.a. gelöst wurde. Das jeweils 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg Diosgenin entsprechende Volumen dieser Lösung (50, 100, 200, 300, 400 und 500 µl) wurde in einem Schliffgläschen zur Trockne eingedampft, das Reagenz zugesetzt, und nach genau

10 Min. die Extinktion der auftretenden Färbung bei 498 nm gemessen. Es wurden für jede Konzentrationsstufe zwei Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert für die Eichkurve herangezogen, wobei die durchschnittliche Abweichung weniger als 4 % betrug.

Da bei der Diosgeninbestimmung aus der Droge Diosgenin nach Chromatographie über eine DC - Platte isoliert wird, wurden zur Feststellung des Isolationsverlustes die angegebenen Diosgeninmengen ebenfalls mit dem DESAGA - Mikrodoser auf eine DC - Platte aufgetragen, analog entwickelt, von der Platte eluiert und nach Reagenzzugabe vermessen. Auch diese Extinktionswerte ergaben gegen die Diosgeninkonzentration aufgetragen eine Gerade, wobei ein durchschnittlicher Verlust von 5,5 % festgestellt wurde. Diese Eichkurve wurde für die quantitative Diosgeninbestimmung herangezogen (s. Abb. 41).

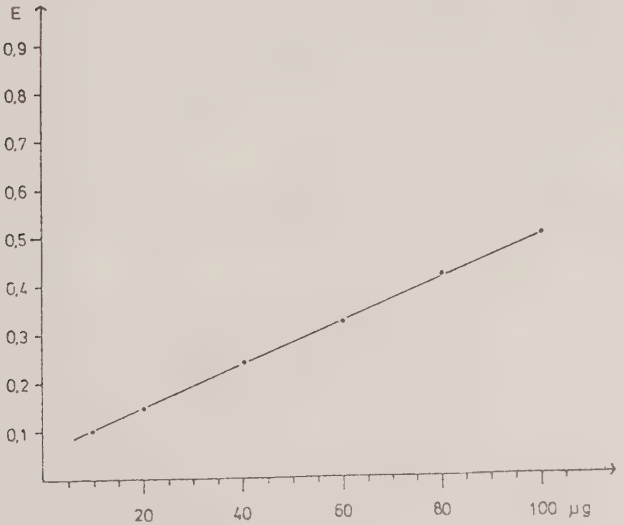


Abbildung 41: Eichkurve für die photometrische Gehaltsbestimmung von Diosgenin mit Antimon(III)-chlorid/Perchlorsäure

Zur Bestimmung der Fehlergrenze wurden jeweils einem aus 10,0 g Droge gewonnenen Methanolextrakt 4,2, 5,3 bzw. 6,1 mg Diosgenin zugefügt und der Diosgeningehalt danach analog bestimmt. Die gefundenen Diosgeningehalte lagen 2,8, 4,1 bzw. 4,3 mg höher als sie für die Droge allein ermittelt wurden. Das entspricht einer Fehlergrenze von 3,5 %.

7. Die Sterine der Rhizome

7.1. Herstellung und Fraktionierung des Petroletherextraktes

964 g getrocknete und gemahlene Rhizome wurden im Soxhlet mit Petrolether (40 - 60 °C) erschöpfend extrahiert. Ausbeute: 9,1 g = 0,94 % vom Rhizom - Trockengewicht.
5 g Petroletherextrakt wurden an 520 g Alumina WOELM N Super I mit Petrolether (40 - 60 °C), Petrolether/Benzol - Gemischen unter Steigerung des Benzolanteils um 10 % pro 500 ml Elutionsgemisch, Benzol/Ethylacetat - Gemischen unter analoger Steigerung des Ethylacetatanteils und Ethylacetat aufgetrennt. Die danach noch auf der Säule verbleibenden Substanzen wurden mit Methanol von der Säule heruntergewaschen. Es wurden Fraktionen von 20 ml aufgefangen und nach DC - Kontrolle im System Petrolether/Ethylacetat/Benzol (80 : 15 : 5) zu 7 Teilfraktionen vereinigt (s. Tab. 20).

7.1.1. Isolierung der frei vorliegenden Sterine

300 mg der Sterinfraktion (Teilfraktion IV) wurden an 265 g Kieselgel mit Benzol/Ether (9 : 1) sc aufgetrennt. Es fielen 156 mg dc einheitliche Sterine an, die aus Aceton umkristallisiert bei 137 - 139 °C schmolzen.

Tabelle 20: Säulenchromatographische Auftrennung von 5 g Petroletherextrakt der Rhizome an Alumina WOELM N Super I

aufgefangene Fraktionen	vereinigt zu Teil-fraktion	Elutions-mittel	Rück-stand (g)	Haupt-komponenten
12 - 142	I	Petrolether; Petrolether/ Benzol	0,928	nicht identifi-zierte Substanzen
143 - 278	II	Petrolether/ Benzol	0,280	Sterinester, nicht identifi-zierte Substanzen
279 - 344	III	Benzol; Ben-zol/Ethyl-acetat	0,416	nicht identifi-zierte Substanzen
345 - 377	IV	Benzol/Ethyl-acetat	0,455	Sterine, nicht identifizierte Substanzen
378 - 432	V	Benzol/Ethyl-acetat	0,135	Sterine, Diosgenin
433 - 542	VI	Benzol/Ethyl-acetat; Ethylacetat	0,462	nicht identifi-zierte Substanzen
Rest	VII	Methanol	1,920	nicht identifi-zierte Substanzen

7.1.2. Isolierung der verestert vorliegenden Sterine

250 mg der Sterinesterfraktion (Teilfraktion II) wurden nach Angaben von SCHREIBER u. OSSKE (1962) mit 30 ml methanolischer Kalilauge (12,5 g KOH + 6 g H_2O + 80 g CH_3OH) 180 Min. lang am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 30 ml Wasser wurde der Ansatz weitere 30 Min. lang am Rückfluß gekocht. Das erkaltete Hydrolysat wurde 5 mal mit je 30 ml Petrolether (40 - 60 °C) und dann 5 mal mit je 30 ml Petrolether/Ether (1 : 1) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser und einmal mit 50 %igem Methanol gewaschen und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels blieben 142 mg unverseifbarer Anteil zurück.
Die aus den Estern freigesetzten Sterine wurden danach durch SC an 18 g Kieselgel mit 250 ml eines Gemisches aus Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80 : 15 : 5) abgetrennt. Dabei fielen 23,8 mg Sterine dc rein an, die den Analysen zugeführt wurden.

7.2. Isolierung der glykosidisch gebundenen Sterine

5 g Methanolextrakt (Herstellung s.S. 152) wurden mit 150 ml 2n methanolischer Salzsäure 4 Std. lang am Rückfluß hydrolysiert, der erkaltete Ansatz mit NH_3 - Lösung neutralisiert, auf etwa die Hälfte des Volumens eingeengt und die gleiche Menge Wasser zugesetzt. Durch 8 maliges Ausschütteln mit je 50 ml Methylenchlorid wurden dem Hydrolysat 1,24 g an unverseifbaren Bestandteilen entzogen.

130 mg des Unverseifbaren wurden an 30 g Alumina WOELM N Super I mit Petrolether und Petrolether/Ether - Gemischen sc aufgetrennt. Es wurden Fraktionen von 8 ml aufgefangen und die Sterine enthaltenden Fraktionen vereinigt. Nach Umkristallisation aus Aceton lagen 26 mg dc reine Sterine vor (Schmp. 136 - 138 °C).

7.3. Quantitative Bestimmung der Sterine, ihrer Ester und Glykoside

7.3.1. Erstellung der Eichkurve

Die Eichkurve wurde mit den aus den Rhizomen isolierten freien Sterinen aufgestellt. 10,0 mg wurden in einem Meßkölbchen zu 1,00 ml Chloroform p.a. gelöst, jeweils 20, 40, 60 und 80 µl mit dem DESAGA - Mikrodoser auf eine Kieselgel - Alufolie (MERCK) aufgetragen und im System Petrolether/Ethylacetat/Toluol (80 : 15 : 5) entwickelt. Die Zone, die in Laufhöhe von mitchromatographiertem Cholesterin lag, wurde ausgeschnitten und mit dem DESAGA - Elutor mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (4 : 1) quantitativ eluiert. Der Rückstand wurde in einem Spitzkolben nacheinander mit 1,00 ml Eisessig, 2,00 ml Essigsäureanhydrid und 0,10 ml konz. Schwefelsäure versetzt, die Lösung unter häufigem Umschwenken 30 Min. lang bei 24 °C gehalten und danach die Extinktion bei 680 nm gegen die Reagenzlösung gemessen. Es wurden jeweils zwei Bestimmungen durchgeführt und die gefundenen Werte gemittelt. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert betrug ± 2,6 %. Die Extinktionswerte ergaben gegen die Sterinkonzentration aufgetragen eine Gerade (s. Abb. 42).

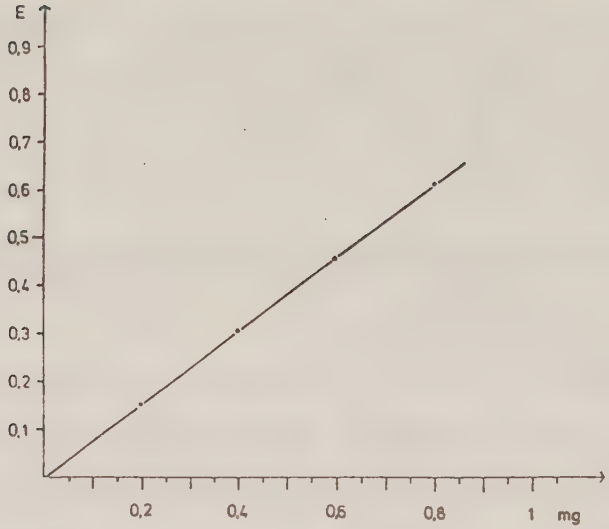


Abbildung 42: Eichkurve für die photometrische Gehaltsbestimmung der Sterine mit LIEBERMANN-BURCHARD - Reagenz

7.3.2. Bestimmung der Gesamtsterine, der freien Sterine sowie der freien und veresterten Sterine aus dem Acetonextrakt

30,0 g getrocknete und gemahlene Rhizome wurden im Soxhlet mit Aceton erschöpfend ausgezogen. Der eingeengte Extrakt wurde in einen Meßkolben überführt und mit Aceton zu 100,0 ml aufgefüllt.

Die Gesamtsterine:

Von 25,00 ml Acetonextrakt wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, der Rückstand in 25 ml 95 %igem Ethanol unter Zusatz von 2 % konz. Schwefelsäure gelöst und 15 Std. lang am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 15 ml 10 %ige ethanolische Kalilauge zugesetzt und erneut 30 Min. lang

zum Sieden erhitzt. Das Hydrolysat wurde nach dem Erkalten in einen Scheidetrichter überführt, 25 ml Petrolether (40 - 60 °C) zugesetzt und dann solange Wasser zugefügt, bis sich 2 Phasen bildeten. Nach Abtrennen des Petrolethers wurde die wässrige Phase 3 mal und nach Zusatz von 10 ml Wasser noch 2 mal mit je 25 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die vereinigten Petroletherextrakte wurden 2 mal mit je 10 ml 90 %igem Methanol gewaschen und dann das Lösungsmittel abgezogen. Zur quantitativen Bestimmung der Gesamtsterine wurde der unverseifbare Rückstand in 2,00 ml Chloroform gelöst. Jeweils 0,1 ml und 0,05 ml dieser Lösung wurden, wie bei der Erstellung der Eichkurve beschrieben, chromatographiert, die Sterinzone eluiert und nach Reagenzzugabe photometrisch vermessen. Es wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt.

Die freien und veresterten Sterine:

25,00 ml Acetonextrakt wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 25 ml 95 %igem Ethanol gelöst und nach Zugabe von 15 ml 10 %iger ethanolischer Kalilauge 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat, wie bei den Gesamtsterinen beschrieben, mit Petrolether extrahiert, zur Trockne eingedampft und zu 2,00 ml Chloroform gelöst. Aus jeweils 1,0 ml und 0,05 ml dieser Lösung wurde analog der Gehalt an freien und veresterten Sterinen photometrisch bestimmt.

Die freien Sterine:

25,00 ml Acetonextrakt wurden zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 25 ml 95 %igem Ethanol gelöst und wie beschrie-

mit Petrolether extrahiert. Der Petroletherrückstand wurde in 2,00 ml Chloroform gelöst, jeweils 0,1 ml und 0,05 ml hiervon dc aufgetrennt, die Zone der frei vorliegenden Sterine eluiert und entsprechend vermessen.

7.3.3. Bestimmung der freien Sterine, der freien und veresterten Sterine sowie der veresterten Sterine aus dem Petroletherextrakt

30,0 g getrocknete und gemahlene Rhizome wurden im Soxhlet mit Petrolether (40 - 60 °C) erschöpfend extrahiert, der eingeengte Extrakt in einen Meßkolben überführt und mit Petrolether zu 100,0 ml aufgefüllt.

Die freien Sterine:

25 ml Petroletherextrakt wurden zur Trockne eingedampft, zu 2,00 ml Chloroform gelöst und jeweils 1,0 ml und 0,05 ml hiervon dc aufgetrennt. Die Zone der freien Sterine wurde eluiert und analog photometrisch bestimmt.

Die freien und veresterten Sterine:

25,00 ml Petroletherextrakt wurde im Vakuum eingedampft, in 15 ml 95 %igem Ethanol gelöst und nach Zugabe von 15 ml 10 %iger ethanolischer Kalilauge 30 Min. lang am Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde der Ansatz wie beschrieben mit Petrolether ausgeschüttelt und die hier anfallenden Sterine danach quantitativ bestimmt.

Die veresterten Sterine:

Der Rückstand von 25,00 ml Petroletherextrakt wurde in 25 ml 95 %igem Ethanol aufgenommen und in der Siedehitze mit 10 ml einer Lösung von 2 % Digitonin in 80 %igem Ethanol

versetzt. Nach kurzem Aufkochen wurden 6 ml Wasser zugefügt und das Ganze erneut zum Sieden gebracht. Der Ansatz blieb über Nacht im Kühlschrank stehen. Anschließend wurden die ausgefallenen Sterin - Digitonide über eine G 3 - Fritte abgetrennt. Die klare Lösung wurde eingedampft, der Rückstand mit 15 ml 10 %iger ethanolischer Kalilauge 30 Min. lang verseift und wie beschrieben weiterbehandelt und vermessen.

7.3.4. Bestimmung der glykosidisch gebundenen Sterine aus dem entfetteten Acetonextrakt

Die mit Petrolether entfettete Droge (30,0 g, s. 7.3.3.) wurde anschließend mit Aceton erschöpfend extrahiert, und der eingeengte Extrakt in einem Meßkolben zu 50,0 ml Aceton gelöst.
Nach dem Eindampfen von 25,00 ml des Acetonextrakts wurde der Rückstand in 25 ml 2 %iger ethanolischer Schwefelsäure gelöst und 15 Std. lang am Rückfluß erhitzt. Die weitere Aufarbeitung und photometrische Bestimmung erfolgte wie beschrieben.

Bei allen quantitativen Bestimmungen wurden jeweils drei Parallelanalysen durchgeführt und die Ergebnisse für die Gehaltsangaben gemittelt. Die Abweichungen vom Mittelwert und der methodische Fehler, der durch Zumischen von definierten Sterinmengen zu den Extrakten bestimmt wurde, lagen unterhalb einer Fehlergrenze von 4 %.

8. Isolierung von frei vorliegendem Diosgenin

135 mg der Teilfraktion V, die nach sc Auftrennung des Petroletherextrakts angefallen war (s. Tab. 20, S. 157), wurden an 22 g Kieselgel mit 1200 ml Petrolether/Benzol/Ethylacetat (80 : 12 : 8) als Elutionsmittel chromatographiert, wobei Fraktionen von 10 ml aufgefangen wurden. Nach DC - Kontrolle mit authentischem Diosgenin wurden die entsprechenden Teilfraktionen vereinigt. Danach lagen nach Umkristallisation aus Aceton 25 mg dc reines Diosgenin vor (Schmp. 206 - 208 ^{o}C).

IX. Literaturverzeichnis*

APLIN, R.T. u. G.M. HORNBY: Application of mass spectrometry to the structural investigation of 9,19-cyclosterols and triterpenes; J. Chem. Soc. B 1078-1079 (1966)

AUDIER, H.E., R. BEUGELMANS u. B.C. DAS: Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes, Part II. The lanostane group: influence of the 9 : 19-cyclopropane ring; Tetrahedron Lett. 36, 4341-4347 (1966)

BALBACH, A.: As Plantas Curam, 29a Edição, 188; Edioções "A Edificação do Lar", São Paulo 1972

BEDI, K.L., Y.K. SARIN u. C.K. ATAL: Costus speciosus as commercial source of Diosgenin; Indian J. Pharm. 6 155-156 (1976)

BHATTACHARYA, S.K., A.K. PARIKH, N.C. NEOGY, R. LAL, P.K. DEBNATH u. V.B. PANDEY: Investigations of the anti-inflammatory and anti-arthritic activities of saponins isolated from Costus speciosus; Rheumatism 6, 1 (1971)

BRAGA, R.: Plantas do Nordeste - especialmente do Ceará, 2a Edição, 118; Imprensa Oficial, Fortaleza/Ceará 1960

CHAKRAVARTI, R.N., S.B. MAHATO, N.P. SAHU, B.C. PAL u. S.C. DATTA: Assay of Costus speciosus plants for Diosgenin; J. Inst. Chem. Calcutta 48, 148-150 (1976)

---

* Die Abkürzungen der Fachzeitschriften erfolgten nach den Angaben des Chemical Abstracts Service Source Index

COPIUS-PEEREBOOM, J.W. u. H. W. BEEKES: The analysis of mixtures of animal and vegetable fats, V. separation of sterol acetates by thin-layer chromatography in reversed-phase systems and on silicea gel G-silver nitrate layers; J. Chromatogr. 17, 99-113 (1965)

CRUZ, G.L.: Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil, 1. Volume, 1a Edição, 220; Belo Horizonte 1965

DA ROCHA, D.: Formulário Therapeutico de Plantas Medicinais Cearenses Nativas e Cultivadas, 3a Edição, 56-57; Ceará 1947

DASGUPTA, B. u. V.B. PANDEY: A new indian source of Diosgenin: Costus speciosus; Experientia 26, 475 (1970)

DAWIDAR, A.M., A.A. SALEH u. S.L. ELMOTEI: Steroid sapogenin constituents of Foenugreek seeds; Planta Med. 24, 367-370 (1973)

DEVEYS, M. u. M. BARBIER: Isolement du pollinastanol et d'une serie de Δ-7-sterols des pollens de deux composées; Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 865-871 (1967)

DEVEYS, M., M. BARBIER u. A. ALCAIDE: Biosynthesis of Cholesterol from Pollinastanol in the Tobacco Nicotiana tabacum; Phytochemistry 8, 1441-1444 (1969)

DIBBERN, H.W., D. OTT u. E. WIRBITZKI: Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln; Dtsch. Apoth. Ztg. 111, 1649-1651 (1971)

DRAGALIN, I.P. u. P.K. KINTYA: Steroidal saponins of Yucca filamentosa: Yuccoside C and Protoyuccoside C; Phytochemistry 14, 1817-1820 (1975)

EICHENBERGER, W. u. E.C. GROB: Über die quantitative Bestimmung von Sterinderivaten in Pflanzen und die intrazelluläre Verteilung der Steringlykoside in Blättern; FEBS Lett. 11, 177-180 (1970)

EVANS, F.J.: Steryl esters of Digitalis purpurea L. herb.; J. Pharm. Pharmacol. 25, 156- 163 (1973)

FISCHER, F. u. R. HERTEL: Dünnschichtchromatographie isomerer Triterpene an Anasil B und Kieselgel/$AgNO_3$; J. Chromatogr. 38, 274-281 (1968)

HEACOCK, R.A. u. M.E. MAHON: The color reactions of the Hydroxyscatoles; J. Chromatogr. 17, 338-348 (1965)

HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. III, 451-455; Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart 1964

HOEHNE, F.C.: Plantas e Substâncias vegetais tôxicas e medicinais, S. 98; São Paulo 1939

HÜGEL, M.F., M. BARBIER u. E. LEDERER: Sur le pollinastanol, nouveau stérol du pollen; Bull. Soc. Chim. 2, 2012-2013 (1964)

IDLER, D.R., S.W. NICKSIC, D.R. JOHNSON, V.W. MELOCHE, H.A. SCHUETTE u. C.A. BAUMANN: Separation and tentative identification of two new sterols from oats; J. Am. Chem. Soc. 75, 1712-1715 (1953)

ITOH, T., T. TAMURA. T. IIDA u. T. MATSUMOTO: Gas chromatographic differentiation of 4-desmethyl, 4-monomethyl and 4,4-dimethylsterols; Steroids 23, 687-698 (1974)

ITOH, T., T. TAMURA, T. MITSUHASHI u. T. MATSUMOTO: Sterols of Liliaceae; Phytochemistry 16, 140-141 (1977)

JAIN, S.C.: Steroidal sapogenins from Trigonalla occulta; J. Nat. Prod. (Lloydia) 39, 244-245 (1976)

JANSSON,P.E., L. KENNE, H. LINDGREN, B. LINDBERG u. J. LÖNNEGREN: A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates; Chem. Commun. 8, 1-75 (1976)

JEFFERIES, T.M. u. R. HARDMAN: The IR-Spektrometric estimation of Diosgenin and Yamogenin individually and as their mixtures; Planta Med. 22, 78-87 (1972)

JEONG, T.M., T. ITOH, T. TAMURA u. T. MATSUMOTO: Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils; Lipids 9, 921-927 (1974)

JOHNSON, J.L., M.F. GROSTIC u. A.O. JENSEN: Determination of stigmasterol in soybean sterol mixtures by infrared method; Anal. Chem. 29, 468-470 (1957)

JOLY, R.A., J. BONNER, R.D. BENNETT u. E. HEFTMANN: Conversion of an open-chain saponin ti Dioscin by a Dioscorea floribunda homogenate; Phytochemistry 8, 1445-1447 (1969)

KAWANO, K., H. SATO u. S. SAKAMURA: Isolation and structure of Furostanol saponin in Asparagus edible shoots; Agric. Biol. Chem. 41, 1-8 (1977)

KAWASAKI, T., T. KOMORI, K. MIYAHARA, T. NOHARA, I. HOSOKAWA u. K. MIHASHI: Furostanol bisglycosides corresponding to Dioscin and Gracillin; Chem. Pharm. Bull. 22, 2164-2175 (1974)

KIYOSAWA, S., M. HUTOH, T. KOMORI, T. NOHARA, I. HOSOKAWA u. T. KAWASAKI: Detection of Proto-type compounds of Diosgenin- and other Spirostanol-Glycosides; Chem. Pharm. Bull. 16, 1162-1164 (1968)

KNIGHTS, B.A.: Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry; J. Gas Chromatogr. 5. 273-282 (1967)

KRAFT, M.: Struktur- und Absorptionsspektroskopie der Steroide und Alkaloide; Thieme Verlag, Stuttgart 1975

LOESENER, T.: Zingiberaceae in Engler-Prantl, die natürlichen Pflanzenfamilien, 2. Aufl., Bd. 15 A, 541-640; Leipzig 1930

MAAS, P.J.M.: Flora Neotropica, Monograph. No. 8: Costoideae (Zingiberaceae), 105-108; Hafner Publishing Company, New York 1972

MATSUO, A., M. NAKAYAMA, S. HAYASHI u. S. NISHIMOTO: Isolation of n-paraffins and sec-alcohols from Isotachis japonica; Phytochemistry 11, 3313-3316 (1972)

MEDICINAL PLANTS OF INDIA Band I, 282-286; Indian council of medical research, New Delhi 1976

MERFORT, I.: Lipophile Inhaltsstoffe der Blätter und Früchte von Symphoricarpus albus (L.) Blake; Dissertation, Universität Düsseldorf 1980

NES, W.R., K. KREVITZ, J. JOSEPH, W.D. NES, B. HARRIS, G.F. GIBBONS u. G.W. PATTERSON: The phytogenetic distribution of sterols in tracheophytes; Lipids 12, 511-527 (1977)

NIELSEN, P.E., H. NISHIMURA, Y. LIANG u. M. CALVIN: Steroids from Euphorbia and other latex-bearing plants; Phytochemistry 18, 103-104 (1979)

PANDEY, V.B. u. B. DASGUPTA: Chemical investigation of Costus speciosus. New source of Diosgenin; J. Inst. Chem. Calcutta 42, 131-134 (1970)

PANDEY, V.B., B. DASGUPTA, S.K. BHATTACHARYA, P.K. DEBNATH, S. SINGH u. A.K. SANYAL: Chemical and pharmalogical investigations of saponins of Costus speciosus; Indian J. Pharm. 34, 116-119 (1972)

PARIKH, A.K., S.K. BHATTACHARYA, N.C. NEOGY, R. LAL u. P.K. DEBNATH: Studies on the antiinflammatory activity of Costus speciosus; Indian J. Pharm. 32, 177-181 (1970)

PETRE, R., R. DENNIS, B.P. JACKSON u. K.R. JETHWA: Thin-layer chromatography of sugars and uronic acids in plant extracts on cellulose; Planta Med. 21, 81-83 (1976)

RAVIKUMAR, P.R., P. HAMMESFAHR u. C.S. SIH: Cytotoxic saponins from the chinese herbal drug Yunnan Bai Yao; J. Pharm. Sci. 68, 900-903 (1979)

RICHTER, W. u. G. WILLUHN: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Sambucus nigra L.; Bestimmung des Ursol- und Oleanolsäure-, des Amyrin- und Steringehaltes der Flores Sambuci DAB 7; Pharm. Ztg. 122, 1567-1571 (1977)

SARIN, Y.K., B.K. KAPAHI, S.K. KAPUR u. C.K. ATAL: Studies on Costus speciosus; I: Variability in diosgenin content; Curr. Sci. 45, 688-690 (1976)

SCHREIBER, K. u. G. OSSKE: Isolierung von Cycloartenol aus den Blättern der Kulturkartoffel Solanum tuberosum L., Sterine und Triterpene II. Mitt.; Kulturpflanze 10, 372-381 (1962)

SINGH, S.B., M.M. GUPTA, R.N. LAL, R.S. THAKUR: Costus speciosus seeds as an additional source of Diosgenin; Plant. Med. 2, 185-186 (1980)

SINGH, S., A.K. SANYAL, S.K. BHATTACHARYA u. V.B. PANDEY: Oestrogenic activity of saponins from Costus speciosus; Ind. J. Med. Res. 60, 287-290 (1972)

SLONEKER, J.H.: Gas-Liquid chromatography of alditol acetates; Methods Carbohydr. Chem. 6, 20-24 (1972)

SOFOWARA, E.A. u. R. HARDMAN: Chromatographic detection and spectrophotometric determination of Diosgenin and other Δ^5-Sapogenins in crude plant extracts; Plant. Med. 26, 385-390 (1974)

SPITELLER, G.: Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen; Verlag Chemie, Weinheim 1966

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1962

TAKAGI, T., A. SAKAI, K. HAYASHI u. T. ITABASHI: Occurrence of plant sterols in aquatic vertebrates; Lipids 14, 5-8 (1979)

TEIXEIRA DA FONSECA, E.: Indicator de madeiras e plantas úteis do Brasil, 88-89; Rio de Janeiro 1922

TOMBINSON, P.B.: Studies in the systematic anatomy of Zingiberaceae; J. Chem. Soc. 55, 547-592 (1956)

TSCHESCHE, R. u. V.B. PANDEY: Steroidal saponins of Costus speciosus; Phytochemistry 17, 1781-1782 (1978)

TSCHESCHE, R. u. G. WULFF: Über die antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen; Z. Naturforsch. 20B, 543-546 (1965)

TSCHESCHE, R. u. G. WULFF: Chemie und Biologie der Saponine; Fortschr. Chem. Org. Naturst. 30, 461-606 (1973)

TSCHESCHE, R., G. LODEKE u. G. WULFF: Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette. II. Sarsaparillosid, ein bis-desmosidisches 22-Hydroxy-furostanol-saponin; Chem. Ber. 102, 1253-1269 (1969)

VOGEL, G.: Zur Pharmakologie von Saponinen; Planta Med, 3, 362-376 (1963)

VROMAN, H.E. u. C.F. COHEN: Separation of sterol acetates by column and thin-layer argentation chromatography; J. Lipid Res. 8, 150-152 (1967)

WALDI, D.: Dünnschichtchromatographie einiger Zucker und Zuckeralkohole; J. Chromatogr. 18, 417-418 (1965)

WALL, M.E., S. SEROTA u. L.P. WITTNAUER: Steroidal Sapogenins XXIV. The hydrochloric acid catalyzed equilibration of 22, 25D- und 22, 25L-Spirostanes; J. Am. Chem. Soc. 77, 3086-3089 (1955)

WICHTL, M.: Die pharmakognostisch-chemische Analyse; Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1971

WILLIAMS, D.H. u. I. FLEMING: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung; Thieme Verlag, Stuttgart 1979

WILLUHN, G. u. J. KÜSTENS: Die quantitative Verteilung der Sterine und Sterinderivate in Organen von Solanum dulcamara; Phytochemistry 14, 2055-2058 (1975)

WILLUHN, G. u. U. KÖTHE: Der Spirostanolgehalt und seine Variabilität in den oberirdischen Organen von Solanum dulcamara L.; Dtsch. Apoth. Ztg. 5, 235-239 (1981)

WOLTERS, B.: Die Verbreitung antibiotischer Eigenschaften bei Saponindrogen; Dtsch. Apoth. Ztg. 47, 1729-1733 (1966)

WULFF, G.: Neuere Entwicklungen auf dem Saponingebiet; Dtsch. Apoth. Ztg, 23, 797-808 (1968)

WYLLIE, S.G. u. C. DJERASSI: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLVI. Mass spectrometric fragmentations typical of sterols with unsaturated side chains; J. Org. Chem. 33, 305-313 (1968)

WYLLIE, S.G., B.A. AMOS u. L. TÖKES: Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids; J. Org. Chem. 42, 725-732 (1977)

L e b e n s l a u f

Günther Horst Pretzsch

Geburtsdatum:	21.5.1950
Geburtsort:	Zeitz (Sachsen-Anhalt)
Eltern:	Lieselotte Pretzsch geb. Melzer
	Horst Pretzsch
Schulbildung:	1956-1960 Volksschule, Winningen/Mosel
	1960-1969 Max von Laue - Gymnasium, Koblenz
Reifeprüfung:	16.6.1969
Praktikantenzeit:	1969-1971 Mosel-Apotheke, Koblenz
Pharm. Vorexamen:	2.7.1971 in Koblenz
Studium der Pharmazie:	SS 1973 - SS 1976 in Berlin
Staatsexamen:	Erster Abschnitt: 19.3.1975
	Zweiter Abschnitt: 21.9.1976
Approbation:	29.10.1976
Promotion:	Beginn der vorliegenden Arbeit am 1.7.1978 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Willuhn. Während dieser Zeit war ich als wissenschaftliche Hilfskraft und als wissenschaftlicher Angestellter tätig.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353